

# **Morphologische Studien zur Beteiligung der Mikroglia an der Glia limitans**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Emely Joost

Geburtsdatum / Geburtsort: 16.07.1991 / Gehrden

angefertigt an / in: Universität Leipzig / Institut für Anatomie

Betreuer: Prof. Dr. med. Ingo Bechmann, PD Dr. med. Martin Krüger

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	3
2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	4
3	Einführung in die Thematik .....	5
3.1	Die neurovaskuläre Einheit.....	5
3.2	Die Bluthirnschranke als funktionelle Besonderheit des zerebralen Gefäßendothels.....	7
3.3	Leukozytenmigration im Rahmen der Neuroinflammation .....	8
3.4	Mikroglia.....	9
3.4.1	Entwicklung und Funktion.....	9
3.4.2	Mikroglia und ZNS-Pathologien .....	12
3.4.3	Mikroglia und die Glia limitans .....	13
3.5	Fragestellung .....	14
4	Publikationsmanuskript.....	15
5	Zusatzmaterial .....	30
6	Zusammenfassung der Arbeit.....	33
7	Literaturverzeichnis .....	37
8	Darstellung des eigenen Beitrags .....	45
9	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	46
10	Curriculum vitae .....	47
11	Danksagung .....	48

# 1 Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
CSF	Zerebrospinale Flüssigkeit (eng: cerebrospinal fluid)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (eng: intercellular adhesion molecule 1)
IPAD	Intramurale periarterielle Drainage (eng: intramural peri-arterial drainage)
ISF	Interstitielle Flüssigkeit (eng: interstitial fluid)
LFA-1	Leukozytenfunktionsassoziiertes Molekül 1 (eng: lymphocyte function-associated antigen 1)
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (eng: major histocompatibility complex)
MS	Multiple Sklerose
NVE	Neurovaskuläre Einheit
SMA	Aktin der glatten Muskulatur (eng: smooth muscle actin)
TJ	Tight Junction
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (eng: vascular cell adhesion molecule 1)
ZNS	Zentrales Nervensystem (eng: central nervous system)

## **2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der NVE in den verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems	5
Abbildung 2: Die zwei Schritte der Leukozytenmigration ins ZNS	9
Abbildung 3: Immunfluoreszenzmarkierung von juxtavaskulären Mikrogliazellen	12

### 3 Einführung in die Thematik

#### 3.1 Die neurovaskuläre Einheit

Die Homöostase des Zentralnervensystems (ZNS) unterliegt einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen und Komponenten der extrazellulären Matrix, welche unter dem Begriff der neurovaskulären Einheit (NVE) zusammengefasst werden (Harder et al. 2002; Biswas et al. 2020). Grundsätzlich kann die NVE in allen Gefäßabschnitten (arteriell, venös, kapillär) in drei verschiedene Kompartimente unterteilt werden (Bechmann et al. 2007; Dyrna et al. 2013), welche durch spezifische Basalmembranen voneinander abgegrenzt werden:

1. die Gefäßwand (vaskuläres Kompartiment)
2. der perivaskuläre (Virchow-Robin) Raum (perivaskuläres Kompartiment)
3. das Neuropil, begrenzt durch die Glia limitans (juxtavaskuläres Kompartiment)

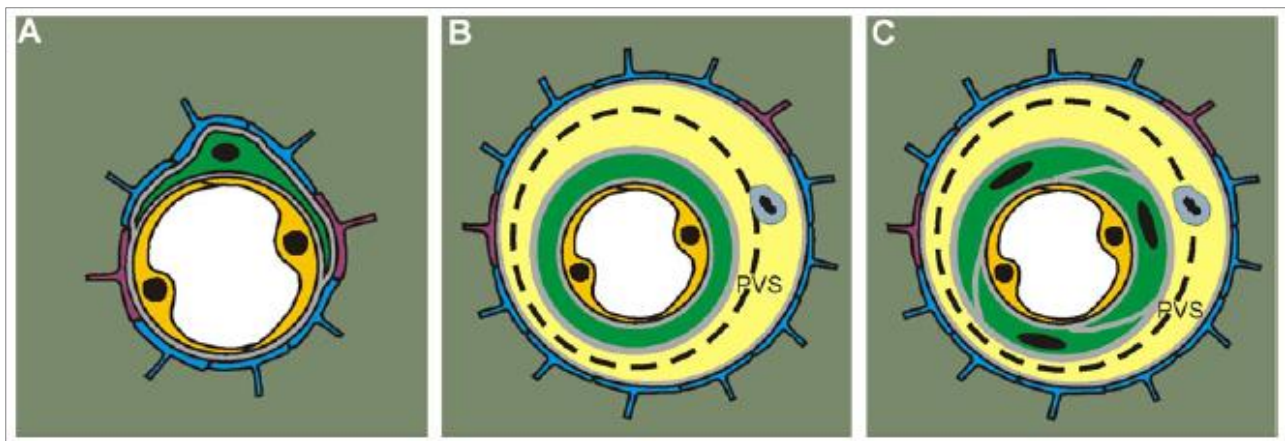


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NVE in den verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems

A: Kapillare, B: postkapilläre Venole, C: Arterien/Arteriolen. Endothelzellen (**gelb**), je nach Gefäßtyp Perizyten (A,B) bzw. glatte Muskelzellen (B,C) (**grün**), Basalmembranen (**grau**), Perivaskulärer Raum (PVS), leptomeningeale mesotheliale Zellen (**gestrichelte Linie**), Astrozytenfortsätze (**blau**), Mikrogliafortsätze (**violett**), Neuropil (**dunkelgrau**). Quelle: (Dyrna et al. 2013)

#### Das vaskuläre Kompartiment

Allen Gefäßabschnitten gemeinsam ist ein Endothel, welches durch Tight Junctions (TJs) verbunden und von einer endothelialen Basalmembran begrenzt ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass TJs unabhängig vom jeweiligen Gefäßsegment in gleicher Dichte verteilt sind (Hanske et al. 2016). Die funktionelle Besonderheit des zerebralen Gefäßendothels wird weiter unten gesondert behandelt.

Weiterer obligater Bestandteil der Gefäßwände der zerebralen Mikrovaskulatur sind Perizyten, die den Endothelzellen, nur getrennt durch eine gemeinsame Basallamina, anliegen. Diese kontraktilen Zellen mesenchymalen Ursprungs sind entscheidend für die Homöostase der Bluthirnschranke, die Regulation des zerebralen Blutflusses und sie sind beteiligt an der Angiogenese (Daneman et al. 2010; Krueger und Bechmann 2010; Hurtado-Alvarado et al. 2014; Stebbins et al. 2019). Die Dichte ihrer Verteilung variiert regional und in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten. In arteriellen Gefäßen finden sich außerdem glatte Muskelzellen, welche eine kontinuierliche Tunica media bilden. In postkapillären, venösen Gefäßen

sind diese nur lückenhaft vorhanden bzw. können gänzlich fehlen (Edvinsson L et al. 1983; Dyrna et al. 2013). Begrenzt werden die glatten Muskelzellen und Perizyten durch eine weitere Basalmembran. Diese fusioniert im Kapillargebiet mit der endothelialen Basalmembran und der Basalmembran der Astrozytenfortsätze zu einer gemeinsamen gliovaskulären Membran (Bechmann et al. 2007; Castro Dias et al. 2019).

#### Das perivaskuläre Kompartiment

Die perivaskulären Räume, auch Virchow-Robin-Räume genannt, werden von leptomeningealen Ausläufern gebildet und sind fakultativer Bestandteil prä- und postkapillärer Gefäße. Auf der vaskulären Seite werden sie von der äußeren Basalmembran der Gefäßwand und auf der parenchymalen Seite von der Basalmembran der Glia limitans begrenzt. Sie enthalten zerebrospinale Flüssigkeit (CSF), leptomeningeale mesotheliale Zellen sowie perivaskuläre Makrophagen (Bechmann et al. 2007).

Die CSF dient dem Abtransport metabolischer Produkte, der Lieferung von Nährstoffen und bietet einen therapeutischen Angriffspunkt im Rahmen von ZNS-Erkrankungen (Albargothy et al. 2018; Aldea et al. 2019). Hierbei bewirkt die Kontraktion der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden arterieller oder größerer venöser Gefäße einen kontinuierlichen Fluss der CSF in den perivaskulären Räumen. Dabei steht die CSF über Aquaporin-4-Kanäle in den Astrozytenfortsätzen mit der Interstitiellen Flüssigkeit (ISF) des Hirnparenchyms in Verbindung (Aldea et al. 2019; Thomas 2019). Die Drainage in extrazerebrale Lymphgefäße und Lymphknoten erfolgt über die Basalmembranen der glatten Muskelzellen, was als intramurale periarterielle Drainage (IPAD) bezeichnet wird (Shetty und Zanirati 2020). Im Kapillargebiet erfolgt die lymphatische Drainage in Abwesenheit eines perivaskulären Raumes entlang der fusionierten gliovaskulären Basalmembran. Alle beschriebenen Mechanismen werden von einigen Autoren unter dem Begriff des „glymphatic system“ zusammengefasst (Engelhardt et al. 2016; Albargothy et al. 2018; Plog und Nedergaard 2018).

Perivaskuläre Makrophagen wurden bereits 1988 von Hickey und Kimura als Zellpopulation mit der Fähigkeit zu Phagozytose und Antigenpräsentation beschrieben (Hickey und Kimura 1988). Bezüglich ihrer Herkunft und Aufrechterhaltung wurden in den vergangenen Jahrzehnten kontroverse Ergebnisse publiziert. Neuere Studien konnten nachweisen, dass perivaskuläre Makrophagen aus Vorläuferzellen entstehen, die morphologisch sowie genetisch große Gemeinsamkeiten mit Mikroglia aufweisen. So bilden perivaskuläre Makrophagen eine relativ stabile Population mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Mitose (Goldmann et al. 2016; Prinz et al. 2017; Kierdorf et al. 2019). Unter physiologischen Bedingungen werden die Zellen durch die Glia limitans am Übertritt in das Neuropil gehindert.

#### Die Glia limitans und das juxtavaskuläre Kompartiment

Als Glia limitans bezeichnet man die Grenze zwischen parenchymalem Neuropil und dem Virchow-Robin-Raum. Gebildet wird sie durch einen dichten Verband an Astrozytenfortsätzen, welche über Dystroglycan, Dystrophin und Aquaporin-4-Kanäle mit einer weiteren spezialisierten Basalmembran in Verbindung stehen

(Agrawal et al. 2006; Castro Dias et al. 2019). Diese enthält andere Laminin-Isoformen als die endotheliale Basalmembran, worauf im Kontext der Leukozytenmigration genauer eingegangen wird. Auf der parenchymalen Seite befinden sich Mikrogliazellen, welche mit ihren Fortsätzen an die Basalmembran der Glia limitans heranreichen (Lassmann et al. 1991; Proding et al. 2011). Diese Beobachtung ist neuroimmunologisch von hohem Interesse und unterstützt die Annahme, dass Mikrogliazellen im Rahmen von Neuroinflammation eine Funktion als „Wächter“ über die Migration von Leukozyten ins Neuropil übernehmen (Engelhardt et al. 2016).

Zum juxtavaskulären Kompartiment zählen neben den bereits erwähnten Mikrogliazellen und Astrozyten auch Neuronen, Oligodendrozyten und die extrazelluläre Matrix, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben werden.

### **3.2 Die Bluthirnschranke als funktionelle Besonderheit des zerebralen Gefäßendothels**

Eine funktionelle Sonderstellung unter allen beschriebenen Bestandteilen der zerebralen Gefäße nimmt das hochspezialisierte Endothel ein, welches gemeinsam mit seiner dazugehörigen Basalmembran das morphologische Korrelat der „Bluthirnschranke“ (Reese und Karnovsky 1967) bildet.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer Barriere zwischen Hirnparenchym und zerebralen Blutgefäßen ergaben sich im Jahr 1885 durch Paul Ehrlichs Versuche zum „Sauerstoffbedarf des Organismus“ (Ehrlich 1885). Nach intravenöser Injektion von Farbstoffen wollte Ehrlich das Färbeverhalten unterschiedlicher Organe und Gewebe untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf ihr Sauerstoffbedürfnis zu ziehen. Hier fiel auf, dass sich das Gehirn im Vergleich zu anderen Organen und Geweben mit hydrophilen Farbstoffen nicht oder nur schwach anfärben ließ. Dieser unbeabsichtigte und für die ursprüngliche Fragestellung hinderliche Befund war fortan Gegenstand vieler Studien. So zeigte Max Lewandowsky 1900 in seiner Schrift „Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit“, dass bei intravenöser Injektion neurotoxischer Substanzen (Strychnin, Ferrozyannatriumlösung) eine vielfach höhere Dosis zum Erreichen gleicher klinischer Symptome notwendig war als bei direkter Injektion der Substanzen in den Subarachnoidalraum. Lewandowsky führte dies auf das Vorhandensein einer „gliösen Grenzmembran“ zurück, welche er auf Ebene der zerebralen Kapillaren vermutete (Lewandowsky).

Edwin E. Goldmann folgte den Versuchen Lewandowskys und Ehrlichs. Er beobachtete, dass auch Plazenta, Eihüllen und Embryo in trächtigen Mäusen von einer Färbung ausgespart blieben. Im Gehirn konnte Goldmann eine Färbung der Hypophyse, der Meningen, der perivaskulären Räume und insbesondere des Plexusepithels feststellen. In letzterem beschrieb er zudem eine phagozytierende Zellpopulation und vermutete, dass dem Plexusepithel dadurch eine Schutz- und Filterfunktion zukomme (Goldmann 1913). Im umgekehrten, Lewandowsky nachempfundenen Versuchsaufbau zeigte sich nach intrathekalen Farbstoffinjektionen zwar eine Färbung des gesamten ZNS und der Hirnhäute, eine Färbung peripherer Organe ließ sich jedoch nicht beobachten (Goldmann 1913). In der Interpretation seiner Experimente zitierte Goldmann Lewandowskys Begriff der „gliösen Grenzmembran“.

Das Phänomen der Bluthirnschranke wurde in den folgenden Jahrzehnten von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert. Den Durchbruch erreichten 1967 Reese und Karnovsky, die mittels Elektronenmikroskopie das ultrastrukturelle Korrelat der Bluthirnschranke aufzeigen konnten (Reese und Karnovsky 1967). Sie beschrieben einen engen Gürtel von TJs auf der Ebene des zerebralen Endothels und schlussfolgerten, dass diese TJs den parazellulären Transport von löslichen Substanzen aus dem Gefäßlumen ins Hirnparenchym verhindern. Zudem beobachteten Reese und Karnovsky ein im Vergleich zu anderen Zellen rares Vorkommen von Transportvesikeln im zerebralen Endothel als weiteren Hinweis für die streng regulierte intrazerebrale Aufnahme löslicher Stoffe. Diese Ergebnisse sind heute von gleichbleibender Aktualität und wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen bestätigt. Auf molekularer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass kleine ungeladene lipophile Moleküle die Bluthirnschranke per Diffusion ungehindert überwinden können. Nährstoffe wie Glukose und Aminosäuren sowie andere größere Moleküle sind hingegen auf spezifische Transportproteine oder die rezeptorvermittelte Transzytose angewiesen (Abbott et al. 2010; Bhalerao et al. 2020). Alterationen der Blut-Hirn-Schranke führen zu einer erheblichen Beeinträchtigung des zerebralen Metabolismus und sind an vielen Neuropathologien wie beispielsweise Epilepsie, Schlaganfällen und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer beteiligt (Profaci et al. 2020; Yu et al. 2020).

### **3.3 Leukozytenmigration im Rahmen der Neuroinflammation**

Die Extravasation von Leukozyten ist neuroimmunologisch von großem Interesse in der Pathogenese von degenerativen und entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS). Sie geschieht hauptsächlich im Bereich postkapillärer Venolen (Cannella et al. 1990; Agrawal et al. 2006) und scheint damit abhängig vom Vorhandensein bestimmter Komponenten der extrazellulären Matrix zu sein. Die Basalmembranen der NVE bestehen aus einem dreidimensionalen Netz von Glykoproteinen, Kollagen IV, Proteoglykanen und verschiedenen Lamininisoformen (Yousif et al. 2013; Thomsen et al. 2017). Die endotheliale Basalmembran besteht hauptsächlich aus Laminin  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ , wohingegen in der parenchymalen Basalmembran Laminin  $\alpha 2$  vorherrscht (Sixt et al. 2001; Wu et al. 2009). Aus diesem Grund sind zum Überwinden der beiden Grenzmembranen unterschiedliche Mechanismen notwendig (Bechmann et al. 2007; Engelhardt und Coisne 2011; Engelhardt et al. 2016): In einem ersten Schritt erfolgt die rezeptorvermittelte Diapedese von Leukozyten durch Endothel und Basalmembran bis in den perivaskulären Raum. Diese wird ermöglicht durch eine feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel der zerebralen Gefäße. Beteiligt an diesem Prozess sind das von aktivierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten exprimierte Integrin  $\alpha 4\beta 1$  und das Leukozytenfunktionsassoziierte Molekül 1 (LFA-1) sowie die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 (Prinz und Priller 2010). Die Bindung erfolgt an das endotheliale vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) sowie das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Liebner et al. 2018). Nach Etablierung einer festen Adhäsion erfolgt der interzelluläre oder vesikelvermittelte transzelluläre Eintritt der Leukozyten in den perivaskulären Raum (Engelhardt und Ransohoff 2005;



Engelhardt und Coisne 2011; Liebner et al. 2018). Im perivaskulären Raum kommt es zur Akkumulation der Leukozyten mit der Ausbildung typischer Leukozyteninfiltrate (eng: perivascular cuffs).

Im zweiten enzymvermittelten Schritt der Leukozytenmigration werden durch perivaskuläre Makrophagen und parenchymale Mikrogliazellen Matrix-Metalloproteinasen (insbesondere MMP-2 und MMP-9) sezerniert (Maeda und Sobel 1996; Hannocks et al. 2017). Diese spalten Dystroglycan-Rezeptoren, welche die Astrozytenfortsätze an der perivaskulären Basalmembran verankern (Agrawal et al. 2006; Könnecke und Bechmann 2013; Engelhardt et al. 2016). Die folgende Destruktion der Glia limitans ermöglicht die Invasion der Leukozyten in das Neuropil. Erst dieser zweite Schritt ist mit dem Beginn klinischer Symptome im Maus-Modell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) assoziiert (Song et al. 2015; Hannocks et al. 2017).

Zusammenfassend sei an dieser Stelle erneut auf die wichtige Nomenklatur der unterschiedlichen morphologisch sehr ähnlichen Zellreihen in der Nähe der Gefäßwände hingewiesen. In Anlehnung an Graeber und Streit unterscheiden wir abhängig von ihrer anatomischen Lage im Bezug zur vaskulären Basalmembran die parenchymale Mikroglia, phagozytierende Makrophagen im Bereich der perivaskulären Räume, Plexusmakrophagen und leptomeningeale Makrophagen (Graeber und Streit 1990; Kierdorf et al. 2019). Diese Zellreihen entstammen ebenfalls aus myeloiden Dottersackzellen und bilden stabile Populationen. Lediglich Plexusmakrophagen unterliegen einem gewissen Austausch durch Monozyten (Prinz et al. 2017). Einen ontogenetisch anderen Ursprung aber ähnliche Morphologie besitzen Perizyten, welche einen Bestandteil der Gefäßwand darstellen (Krueger und Bechmann 2010).

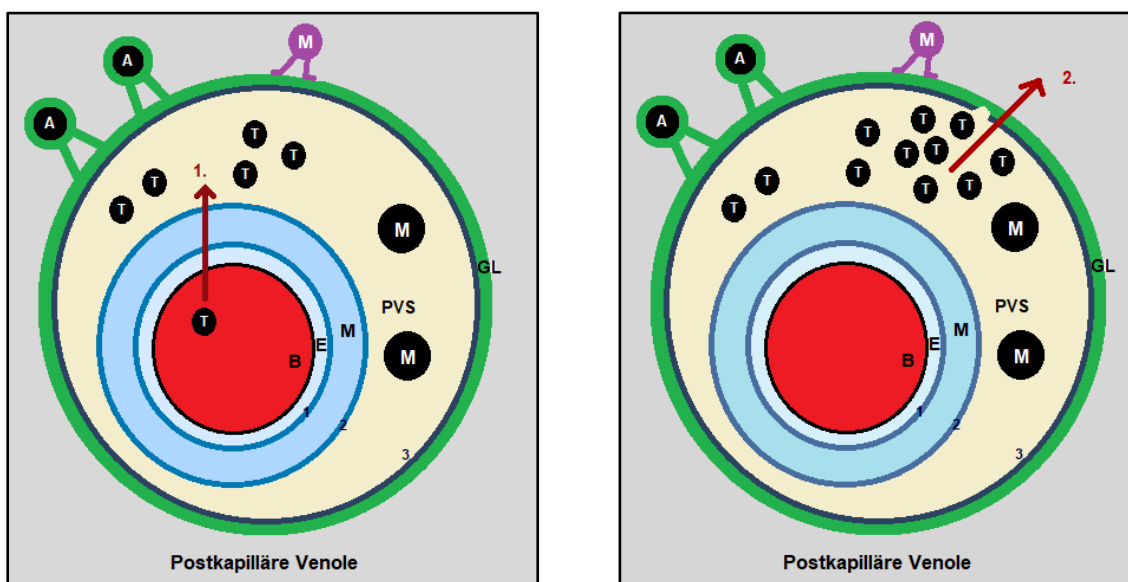


Abbildung 2: Die zwei Schritte der Leukozytenmigration ins ZNS

Die Bestandteile der NVE: Blutgefäß (B), Endothel (E), Tunica media (blau, M), Perivaskulärer Raum (PVS), Glia limitans (GL), Astrozyten (A), Mikroglia (violett, M), T-Lymphozyten (T), Makrophagen (schwarz, M). Die Basalmembranen des Endothels (1), der Gefäßwand (2) und der Glia limitans (3). Links: Migration der Leukozyten in den perivaskulären Raum. Rechts: Destruktion der Glia limitans und Invasion der Leukozyten in das Neuropil. Abbildung adaptiert nach: (Bechmann et al. 2007)

### **3.4 Mikroglia**

#### **3.4.1 Entwicklung und Funktion**

Der Begriff „Mikroglia“ wurde erstmals 1919 durch Pio del Rio Hortega verwendet, welcher neben Neuronen und Astrozyten eine dritte Zellreihe beschrieb (Rio-Hortega 1939; Sierra et al. 2016). Mikroglia sind mesenchymalen Ursprungs und entstehen in der Embryonalphase im Dottersack aus erythromyeloiden Vorläuferzellen (Alliot et al. 1999; Ginhoux et al. 2010; Mosser et al. 2017). Um den 9. Tag der Embryonalentwicklung konnten in der murinen Neuralfalte Mikroglia-Vorläuferzellen nachgewiesen werden, welche in Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren Pu.1 und Irf8 zu reifen Mikrogliazellen ausdifferenzieren (Kierdorf et al. 2013a). Diese sind in den verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich dicht angesiedelt. So finden sich beispielsweise in der grauen Substanz deutlich mehr Mikrogliazellen als in der weißen Substanz. Die Substantia nigra ist mit einem Anteil von 12% an der Gesamtzellzahl am dichtesten mit Mikrogliazellen besiedelt (Lawson et al. 1990).

Lange Zeit galt die Annahme, dass Mikrogliazellen einem kontinuierlichen Austausch durch Blutmonozyten unterliegen (Lawson et al. 1992; Priller et al. 2001; Hess et al. 2004). Die Ergebnisse wurden nach myeloablativer Bestrahlung und anschließender Transfusion von Knochenmarkszellen gewonnen, was die Integrität der Gefäßwand vorübergehend beeinträchtigt. Die beschriebene Migration von Monozyten ins Neuropil ist daher am ehesten als Artefakt der Bestrahlung anzusehen (Diserbo et al. 2002; Li et al. 2004; Askew et al. 2017).

Andere Arbeitsgruppen beschrieben bereits 1988 die Fähigkeit von Mikrogliazellen zur Mitose (Graeber et al. 1988). Fast 20 Jahre später konnten Ajami et al. unter Verwendung chimärer Mäuse mittels Parabiose mit GFP-markierten Makrophagen nachweisen, dass sich die Mikroglia-Population durch ihre Fähigkeit zur Mitose während der gesamten Lebensspanne stabil hält. Mehrere Arbeitsgruppen bestätigten die Beobachtung, dass unter physiologischen Bedingungen keine Migration von Monozyten ins Neuropil zu beobachten ist (Ajami et al. 2007; Mildner et al. 2007; Ajami et al. 2011; Askew et al. 2017). Unter besonderen Bedingungen, wie nach Induktion einer EAE, sind Infiltrate monozytärer Zellen im ZNS nachweisbar. Diese Zellen durchlaufen eine Ausdifferenzierung zu Mikroglia, lassen sich jedoch nach einer Erholungsphase nicht mehr im Neuropil nachweisen und tragen damit nicht langfristig zum Mikroglia-Pool bei (Ajami et al. 2011; Kierdorf et al. 2013b). Aktuelle Studien beschreiben eine regional unterschiedliche Kapazität von Mikrogliazellen zur Mitose (Tay et al. 2017).

Mikrogliazellen steuern die Entwicklung und Reifung der Nervenzellverbände und begleiten die Angiogenese (Schafer et al. 2012; Parkhurst et al. 2013). Durch die Induktion von Apoptose und Phagozytose defekter Zellen sind sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS und insbesondere der Neuroplastizität beteiligt (Wake et al. 2009; Luca et al. 2020). Zudem nehmen sie die zentrale Rolle in der Immunabwehr des ZNS wahr und überwachen ihre Umgebung durchgehend auf Noxen und eindringende Mikroorganismen (Nimmerjahn et al. 2005; Ginhoux et al. 2013; Kierdorf und Prinz 2017). Im Rahmen akuter Überaktivierung, chronischer Aktivitätszustände oder Dysfunktion wie beispielsweise

dem Verlust der Selbsttoleranz, werden Mikroglia mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Neuropathologien in Zusammenhang gebracht (Hickman et al. 2018).

Der Begriff Mikroglia suggeriert das Vorhandensein einer homogenen Zellpopulation. Jedoch unterscheiden sich Mikroglia in ihrer Funktion und ihrem Immunphänotyp maßgeblich (Ford et al. 1995; Gertig und Hanisch 2014). Die frühere Unterscheidung in ruhende und aktivierte Mikrogliazellen scheint heute jedoch obsolet oder zumindest zu einfach. Im physiologischen Zustand zeichnen sich Mikroglia durch prominente Somata und fein verzweigte Fortsätze aus, mit denen die Umgebung auf Noxen überprüft wird (Nimmerjahn et al. 2005; Paris et al. 2018). Im Rahmen von ZNS-Pathologien nehmen Mikrogliazellen eine amöbenförmige Konfiguration an. Ihre Fortsätze erscheinen verplumpt und deutlich weniger verzweigt (Lawson et al. 1990; Kreutzberg 1996; Mittelbronn et al. 2001). Je nach Stimulus verändert sich auch die Expression verschiedener Marker und Zytokine (Gertig und Hanisch 2014). Prodinger et al. beschreiben eine CD11c-positive Subpopulation, welche als Reaktion auf inflammatorische Stimuli MHC-II (eng: major histocompatibility complex) exprimieren kann (Prodinger et al. 2011; Immig et al. 2015). Diese Zellen konnten insbesondere juxtavaskulär und in Prädilektionsstellen für MS nachgewiesen werden. Lange Zeit wurden in Anlehnung an die Klassifizierung von M1- und M2-Makrophagen auch bei Mikroglia zwei Aktivierungszustände (M1/M2-Mikroglia) unterschieden. Michelucci et al. beschrieben, dass Mikroglia nach Aktivierung durch LPS und Interferon- $\gamma$  eher eine proinflammatorische M1-Differenzierung annehmen und nach Stimulation durch IL-4 und IL-10 eher antiinflammatorische Zytokine im Sinne eines M2-Phänotyps sezernieren (Michelucci et al. 2009; O'Loughlin et al. 2018). Diese Darstellung wird der Komplexität der mikroglialen Subpopulationen jedoch nicht gerecht (Ransohoff 2016). Vielmehr werden mittlerweile mindestens sechs verschiedene Mikrogliapopulationen mit regional unterschiedlicher Expression und unterschiedlichen Funktionen beschrieben (Stratoulas et al. 2019).

Aufgrund ihrer langen Lebensdauer unterliegen Mikrogliazellen einem Alterungsprozess. Veränderungen im Alter umfassen eine Vergrößerung der Somata, Verkürzung der Fortsätze sowie eine veränderte Verteilung der Mikrogliazellen im ZNS (Sierra et al. 2007; Tremblay et al. 2012). Ihre Verteilung ist deutlich weniger homogen, auch die Reaktion auf Verletzungen scheint deutlich verzögert, überschießende und prolongierte Inflamationsreaktionen sind häufiger (Hefendehl et al. 2014; Wolf et al. 2017). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine lichtmikroskopisch nachgewiesene Mikrogliafragmentierung jedoch am ehesten auf einer inhomogenen Verteilung typischer Mikroglia marker beruht (Tischer et al. 2016).

Die Forschung an Mikrogliazellen wurde bislang durch das Fehlen eindeutiger Mikroglia marker erschwert. Bisherige Marker (wie beispielsweise Isolectin-B4, Iba-1, CD11b, CD68, CX3CR1) markieren neben Mikroglia auch meningeale und perivaskuläre Makrophagen, welche morphologisch und molekulargenetisch große Überschneidungen mit Mikroglia aufweisen (Ford et al. 1995; Ito et al. 1998; Jung et al. 2000; Kohler 2007; Wieghofer et al. 2015). Lange Zeit war eine sichere Unterscheidung der unterschiedlichen Makrophagen-Populationen daher nur mittels fate mapping Analyse des Leukozytenmarkers CD45 möglich, welcher in Mikroglia weniger exprimiert wird als in perivaskulären Makrophagen (Ford et al. 1995). In jüngster Zeit

konnten der Purinrezeptor P2Y<sub>12</sub> (Hickman et al. 2013; Butovsky et al. 2014; Goldmann et al. 2016; Mildner et al. 2017) und das Transmembranprotein TMEM119 (Bennett et al. 2016) als spezifische Mikroglia marker etabliert werden. P2Y<sub>12</sub> wurde bereits als zuverlässiger Mikroglia-Marker im menschlichen Gewebe bestätigt (Mildner et al. 2017). Beschrieben wurden mittlerweile eine konstante Expression von P2Y<sub>12</sub> und TMEM119 unter physiologischen Bedingungen und eine Herunterregulierung von P2Y<sub>12</sub> im Rahmen von Neuroinflammation (Jordão et al. 2019).

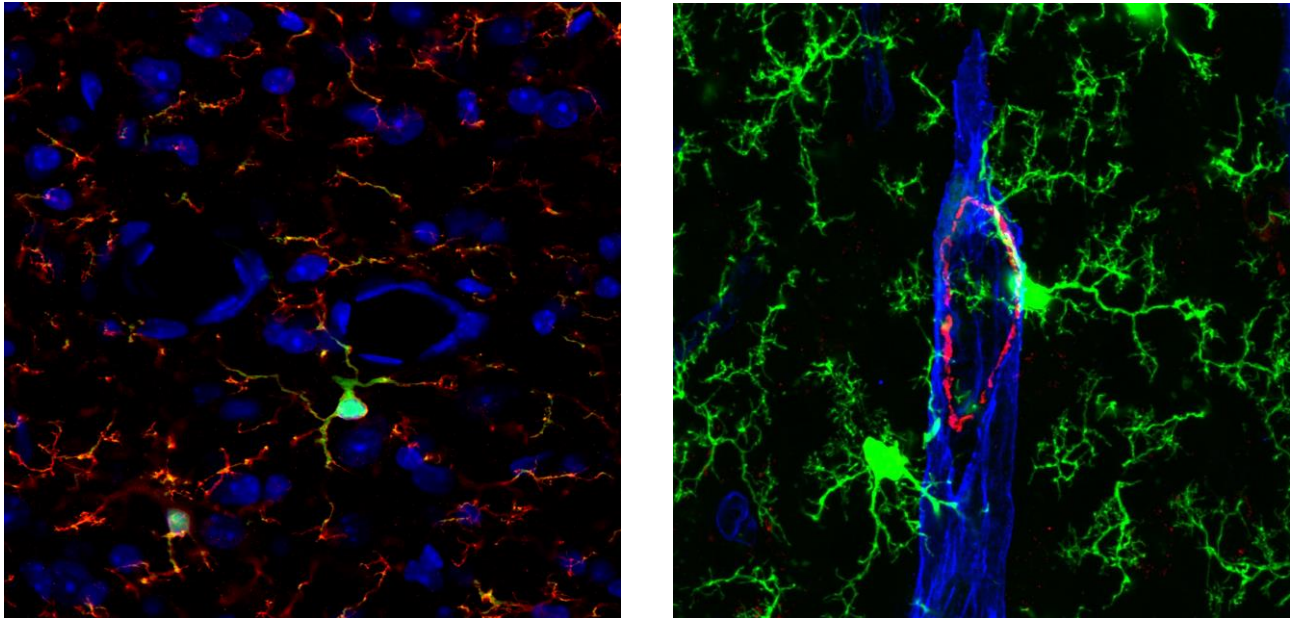


Abbildung 3: Immunfluoreszenzmarkierung von juxtavaskulären Mikrogliazellen

Links: Die Immunfluoreszenzmarkierung des Mikroglia markers P2Y<sub>12</sub> in CX3CR1<sup>+/-GFP</sup>-Mäusen zeigt eine Kolo kalisation von P2Y<sub>12</sub> (rot) mit dem CX3CR1-bezogenen GFP-Signal (grün). Zellkerne wurden mittels DAPI ange färbt (blau).

Rechts: Mittels Immunfluoreszenzmarkierung von CX3CR1<sup>+/-GFP</sup>-Mäusen lassen sich Kontakte von GFP-positiven Mikrogliazellen (grün) mit einer Arterie darstellen. Vaskuläre und gliale Basalmembran (blau) wurden mittels Anti-Laminin-Antikörper markiert, glatte Muskelzellen in der arteriellen Gefäßwand mittels SMA-Immunfluoreszenzmarkierung (=smooth muscle antigen, rot).

### 3.4.2 Mikroglia und ZNS-Pathologien

Die Beteiligung von Mikroglia an der Entstehung und Aufrechterhaltung von unterschiedlichen ZNS-Pathologien wie beispielsweise ALS (Cooper-Knock et al. 2017), M. Parkinson (Sanchez-Guajardo et al. 2015) und M. Alzheimer (Streit et al. 2009; Sweeney et al. 2018) ist unbestritten, genaue Mechanismen sind jedoch bis heute nicht vollständig erforscht (Colonna und Butovsky 2017; Kronenberg et al. 2017). Im Rahmen von ischämischen zerebralen Insulten scheinen Mikroglia die Permeabilität der Gefäßwände zu erhöhen und ischämische Endothelzellen zu phagozytieren (Jolivel et al. 2015; Su et al. 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit nutzen wir ein Tiermodell der MS, weshalb an dieser Stelle der Fokus auf dieses Krankheitsbild gelegt werden soll. MS ist eine autoimmun vermittelte demyelinisierende ZNS-Erkrankungen. Durch Verlust der Selbsttoleranz kommt es zur Aktivierung peripherer Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Mikrogliazellen. Veränderungen der Bluthirnschranke und der Zusammenbruch der Glia limitans ermöglichen die Infiltration peripherer Zellen ins Neuropil (Lassmann et al. 2012; Goldmann und Prinz 2013; Guerrero und Sicotte 2020). Vor allem im Bereich postkapillärer Venolen bilden sich typische leukozytäre Infiltrate aus, welche zur Demyelinisierung und Degeneration im Bereich der weißen

Substanz führen (Hickman et al. 2018). Klinische Symptome sind progrediente neurologische Ausfälle, welche initial meist einen schubförmigen Verlauf mit Rekonvaleszenz nehmen und im Verlauf der Erkrankung in einen chronisch progrediente Form übergehen (Lassmann et al. 2012). Es existieren unterschiedliche Tiermodelle für die Induktion von MS (Gao und Tsirka 2011; Ransohoff 2012), von denen jedoch keines alle bisher bekannten Pathogenitätsfaktoren der MS beinhaltet (Lassmann und Bradl 2017). Am besten untersucht und im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wird das Modell der EAE (Swanborg 1995; Stromnes und Goverman 2006; Ransohoff und Engelhardt 2012).

Unterschiedliche Forschungsergebnisse weisen auf eine starke mikrogliale Beteiligung bei der Entstehung der MS hin. 1996 beschrieben Maeda et al. bereits, dass Mikrogliazellen in MS-Demyelinisierungsherden vermehrt Matrix-Metalloproteinasen sezernieren, welche die Integrität der Basalmembran der Glia limitans zerstören (Maeda und Sobel 1996). Zudem konnte nach pharmakogenetisch induzierter Paralyse von Mikroglia nachgewiesen werden, dass die EAE-Symptome deutlich vermindert werden (Heppner et al. 2005). Laut heutigem Stand der Forschung sind Mikrogliazellen in allen Stadien der MS beteiligt. Einerseits übernehmen sie proinflammatorische Funktionen durch Sekretion von Proteasen und proinflammatorischen Zytokinen, Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und folgender Schädigung von Neuronen und Oligodendrozyten (Schettters et al. 2017). Andererseits sind sie entscheidend für die Phagozytose von Abfallprodukten und Remyelinisierung zur Protektion von Neuronen verantwortlich (Hickman et al. 2018; Guerrero und Sicotte 2020). Damit erscheint die Beeinflussung von Mikroglia-Funktionen als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von MS und anderen neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen, wenngleich die Übertragung von Forschungsergebnissen aus dem Mausmodell auf den Menschen nicht immer gelingt (Lassmann 2020).

### **3.4.3 Mikroglia und die Glia limitans**

Die Assoziation zwischen Mikrogliafortsätzen und der Glia limitans wurde bereits 1991 von Lassmann et al. beschrieben. In elektronenmikroskopischen Studien waren in 4-13% der untersuchten Gefäße Mikrogliafortsätze zwischen den Astrozytenfortsätzen der Glia limitans inkorporiert (Lassmann et al. 1991). Da diese Mikrogliakontakte entlang der Glia limitans als Grenze zum perivaskulären Raum eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten im Sinne einer Wächterfunktion (Engelhardt et al. 2016) spielen sollen, wäre es entscheidend zu wissen, ob sich Mikrogliakontakte regelhaft entlang des Gefäßbaums, oder nur in bestimmten Gefäßabschnitten finden lassen, die für die Rekrutierung von Zellen im Rahmen der Neuroinflammation eine Rolle spielen.

Eine Beteiligung der Mikroglia an der Bildung der Glia limitans entlang von präkapillären arteriellen Gefäßen, im Kapillarbett und entlang von postkapillären Venolen wurde bislang jedoch nicht systematisch untersucht.

### 3.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Beteiligung von Mikrogliafortsätzen an der Glia limitans unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Bisherige Arbeiten beschreiben wiederholt die Assoziation von Mikrogliazellen und der Glia limitans, eine systematische Analyse und Quantifizierung liegt bisher jedoch nicht vor. Die vorliegende Arbeit orientiert sich daher an folgenden Fragestellungen:

1. Ist das Auftreten von Kontakten zwischen Mikrogliazellen und der perivaskulären Glia limitans auf bestimmte Gefäßabschnitte beschränkt oder lassen sich Kontakte in allen Segmenten des Gefäßsystems nachweisen?
2. Sind abhängig vom Gefäßtyp Unterschiede in der Verteilung dieser Kontakte nachweisbar?
3. Welche Veränderungen ergeben sich unter inflammatorischen Bedingungen?
4. Ist der Nachweis von Mikrogliakontakten zur Glia limitans auch im menschlichen Gewebe möglich?

Diese Fragen adressierten wir mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Mehrfachfluoreszenzmarkierungen unter physiologischen Bedingungen und im Rahmen der Neuroinflammation im Mausmodell sowie in humanen Gewebeproben von Körperspendern des Instituts für Anatomie.

**Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins  
under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human  
brain tissue**

Emely Joost<sup>1</sup>, Marta JC Jordão<sup>2,3</sup>, Bianca Mages<sup>1</sup>, Marco Prinz<sup>2,4</sup>,

Ingo Bechmann<sup>1\*</sup> & Martin Krueger<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institut für Anatomie, Universität Leipzig, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig

<sup>2</sup> Institute für Neuropathologie, Universität Freiburg, Breisacher Straße 64, 79106 Freiburg

<sup>3</sup> Biologische Fakultät , Universität Freiburg, Freiburg

<sup>4</sup> BIOS Zentrum für Biologische Signalstudien, Universität, Freiburg

*Reproduced with permission from Springer Nature*



# Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain tissue

Emely Joost<sup>1</sup> · Marta J. C. Jordão<sup>2,3</sup> · Bianca Mages<sup>1</sup> · Marco Prinz<sup>2,4</sup> · Ingo Bechmann<sup>1</sup> · Martin Krueger<sup>1</sup>

Received: 17 September 2018 / Accepted: 12 January 2019 / Published online: 31 January 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Microglia represent resident immune cells of the central nervous system (CNS), which have been shown to be involved in the pathophysiology of practically every neuropathology. As microglia were described to participate in the formation of the astroglial glia limitans around CNS vessels, they are part of the neurovascular unit (NVU). Since the NVU is a highly specialized structure, being functionally and morphologically adapted to differing demands in the arterial, capillary, and venous segments, the present study was aimed to systematically investigate the microglial contribution to the glia limitans along the vascular tree. Thereby, the microglial participation in the glia limitans was demonstrated for arteries, capillaries, and veins by immunoelectron microscopy in wild-type mice. Furthermore, analysis by confocal laser scanning microscopy revealed the highest density of microglial endfeet contacting the glial basement membrane around capillaries, with significantly lower densities around arteries and veins. Importantly, this pattern appeared to be unaltered in the setting of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mice, although perivascular infiltrates of blood-borne leukocytes predominantly occur at the level of post-capillary venules. However, EAE animals exhibited significantly increased contact sizes of individual microglial endfeet around arteries and veins. Noteworthy, under EAE conditions, the upregulation of MHC-II was not limited to microglia of the glia limitans of veins showing infiltrates of leukocytes, but also appeared at the capillary level. As a microglial contribution to the glia limitans was also observed in human brain tissue, these findings may help characterizing microglial alterations within the NVU in various neuropathologies.

**Keywords** Microglia · Glia limitans · Basement membrane · Neurovascular unit

Ingo Bechmann and Martin Krueger these authors equally contributed

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00429-019-01834-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ingo Bechmann  
ingo.bechmann@medizin.uni-leipzig.de

✉ Martin Krueger  
martin.krueger@medizin.uni-leipzig.de

<sup>1</sup> Institute of Anatomy, Leipzig University, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig, Germany

<sup>2</sup> Institute of Neuropathology, University of Freiburg, Breisacher Straße 64, 79106 Freiburg, Germany

<sup>3</sup> Faculty of Biology, University of Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>4</sup> BIOS Centre for Biological Signalling Studies, University of Freiburg, Freiburg, Germany

## Introduction

Microglia represent the resident immune cells of the CNS (Kierdorf and Prinz 2017) with numerous functions under physiological and pathological conditions (Wolf et al. 2017). Among the different populations, microglia have been shown to contribute to 12–16% of cells within the CNS (Lawson et al. 1990; Mittelbronn et al. 2001). Since microglia as well as perivascular, meningeal, and choroid plexus macrophages are regarded as myeloid cells, they were initially believed to be of mesodermal origin. However, according to the currently accepted view, microglia are believed to predominantly derive from early yolk sac precursors (Alliot et al. 1999; Ginhoux et al. 2010; Kierdorf et al. 2013), which was also recently demonstrated for the non-parenchymal macrophages residing at the brain interfaces (Goldmann et al. 2016). Although a turnover of the microglial pool is potentially possible under defined conditions (Bechmann et al.



2005; Mildner et al. 2007), the contribution of blood-borne monocytes to the microglial pool proved only temporary, whereas the majority of microglia is regarded as a stable and self-renewing population throughout life (Ajami et al. 2007; Askew et al. 2017; Tay et al. 2017). With increasing age other glial cells as well as neurons rather decrease in number, while the relative numbers of microglia are shown to increase due to their capacity of self-renewal (Poliani et al. 2015; Tremblay et al. 2012). However, aged microglia undergo changes with respect to their morphology and function (Hefendehl et al. 2014; Sierra et al. 2007). Thereby, impaired microglial function or ‘senescence’ is characterized by a cellular dystrophy and partial fragmentation as indicated by an inhomogeneous cytoplasmic distribution of the microglia marker Iba-1 (Streit et al. 2009; Tischer et al. 2016).

Microglia are reported to play crucial roles in virtually every neuropathology including prion diseases, Alzheimer disease (AD), Parkinson disease, amyotrophic lateral sclerosis, or multiple sclerosis (Colonna and Butovsky 2017; O’Loughlin et al. 2018). Therefore, studying microglia under physiological and pathological conditions is mandatory for the development of respective treatment strategies. However, over the last decades, this research was inflicted by the lack of a specific microglia marker, which would allow differentiation of microglia from other brain macrophages or blood-derived myeloid cells under inflammatory conditions. Despite the broad spectrum of established microglial markers such as isolectin-B4, Iba-1, CD11b, CD68, none of them allows a clear-cut differentiation of microglia and meningeal or perivascular macrophages (Mildner et al. 2017). Even the widely applied mouse model genetically targeting the fractalkine receptor CX3CR1 with the green fluorescent protein (GFP) does not allow a discrimination of the different brain macrophages. Instead, it rather uniformly labels microglia in line with perivascular, meningeal, or choroid plexus macrophages as well as peripheral macrophages and monocytes (Jung et al. 2000; Wieghofer et al. 2015). However, recently, the transmembrane protein 119 (TMEM 119) and the P2Y12 receptor were identified to discriminate between microglia and the other brain macrophages (Bennett et al. 2016; Mildner et al. 2017).

Although the term microglia is commonly used as the plural form, microglia do not represent a uniform, but a heterogeneous population (Gertig and Hanisch 2014). This heterogeneity is not only reflected by different functions, but also by differing immune phenotypes (M1 vs. M2) as well as differing expression patterns of diverse proteins such as MHC-II or co-stimulatory molecules (Gertig and Hanisch 2014). In this context, our group demonstrated the presence of a distinct subpopulation of microglia which shares certain features of dendritic cells. This subpopulation is characterized by the expression of the complement receptor marker CD11c under

control conditions and is further capable to express MHC-II (Prodinger et al. 2011; Immig et al. 2015). Of note, these cells were not only described to reside in predilection areas of multiple sclerosis but also to participate in the formation of the perivascular glia limitans (Prodinger et al. 2011). This structure is predominantly constituted by astrocytic endfeet and the adjacent astroglial basement membrane, which delineates the CNS parenchyma from the vascular compartment. Here, the contact of astrocytes with cerebral vessels not only orchestrates the development and maintenance of blood–brain barrier function (Zhao et al. 2015), but it also provides a crucial check point for extravasating leukocytes in the setting of neuroinflammation (Bechmann et al. 2007).

Although the perivascular glia limitans is primarily established by astrocytic endfeet, a participation of microglial endfeet has already been described more than 25 years ago (Lassmann et al. 1991). However, this intimate contact to the NVU has recently turned into focus again as microglia have been shown to promote vascular permeability and to be even involved in the phagocytosis of ischemic endothelial cells (Jolivel et al. 2015; Su et al. 2017). Furthermore, a microglial participation in the perivascular glia limitans (subsequently addressed as glia limitans) supports the view of microglial cells as possible gatekeepers for leukocytes to enter the neuropil upon extravasation under inflammatory conditions (Engelhardt et al. 2016). However, the cellular and molecular composition of the NVU including the presence of perivascular spaces is known to differ in arterial, capillary, and venous segments of the cerebral vasculature, thereby impacting on leukocyte recruitment (Dyrna et al. 2013; Sixt et al. 2001; Wu et al. 2009; Yousif et al. 2013). In this context, the question remains, whether the microglial contribution to the glia limitans is limited to post-capillary venules as sites of preferred leukocyte entry, or rather represents a universal feature of each segment of the vascular tree. Therefore, the present study is aimed to investigate and characterize the microglial contribution to the perivascular glia limitans in the arterial, capillary, and venous segments of the vascular tree. For this purpose, the analyses comprised immunoelectron microscopy and confocal laser scanning microscopy in CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice (Jung et al. 2000) under physiological conditions, as well as human post-mortem brain tissue. Furthermore, the participation of microglial endfeet in the formation of the glia limitans was addressed using CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mice in chronic and acute stages of EAE.

## Materials and methods

### Experimental setup

All experiments involving animals were performed along the ARRIVE guidelines and according to the European Union

Directive 2010/63/EU. The animals used for our experiments were kept under pathogen-free conditions with free access to food and water. For electron microscopy, brain tissue obtained from five wild-type C57Bl/6 mice were used, whereas fluorescence microscopy analyses comprised tissue obtained from 6 CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice (Jung et al. 2000) to analyse the contribution of microglial endfeet to the perivascular glia limitans under physiological conditions. To characterize the participation of microglia in the formation of the glia limitans in the setting of neuroinflammation, we applied the model of EAE in CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato mice to differentiate resident microglia from blood-borne macrophages. Thereby, the analyses comprised spinal cord tissue obtained from the chronic phase ( $n=5$ ), the acute phase ( $n=6$ ) and non-immunized controls ( $n=3$ ). Human post-mortem brain tissue was obtained from a body donor without evidence of any neurodegenerative diseases from the Institute of Anatomy at Leipzig University after institutional approval for the use of post-mortem tissues from the Institute of Anatomy at Leipzig University and in line with the Saxonian Death and Funeral Act of 1994, third section, paragraph 18, item 8. All authors declare that all experiments have been conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

### EAE induction in CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato mice

In CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato mice, EAE was induced as previously described (Goldmann et al. 2013, 2016). In brief, mice were subcutaneously immunized with 200 µg of MOG<sub>35–55</sub> peptide in Freund's complete adjuvant containing 1 mg of Mycobacterium tuberculosis (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Furthermore, mice received 250 ng of pertussis toxin via an intraperitoneal injection at the time of immunization and 48 h later. Mice were then subsequently analysed in the acute phase (score 3, typically between 15 and 17 days post immunization) and in the chronic phase (day 30 post immunization) of EAE.

### Mouse tissue

CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice ( $n=6$ ) were transcardially perfused with saline followed by a fixative containing 4% paraformaldehyde (PFA, Serva, Heidelberg, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were carefully removed and allowed to postfix overnight in the same fixative. Serial sections of 50 µm thickness were prepared using a vibrating microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Until use, the sections were stored in PBS containing sodium azide at 4 °C.

EAE spinal cord tissue of CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato mice was fixed in 4% PFA (Serva) followed by cryoprotection in 30% sucrose with subsequent freezing and

preparation of cryostat sections. Until use, cryostat sections were stored at −20 °C.

### Human brain tissue

Human post-mortem brain tissue was immersion-fixed in 4% PFA (Serva) formaldehyde-fixed, dehydrated, and embedded into paraffin. Paraffin sections were obtained on a microtome (Leica Microsystems). Sections were then deparaffinized in xylol and stepwise rehydrated in graded alcohol. Prior to immunofluorescence labeling, antigen retrieval was applied in citrate buffer (pH 6) at 96 °C for 10 min.

### Fluorescence microscopy

For fluorescence microscopy, formaldehyde-fixed mouse brain and spinal cord sections were blocked with 5% normal goat serum (NGS) or bovine serum albumin (BSA), respectively, and 0.5% Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, Germany) in PBS. To demark blood vessels and their surrounding basement membranes, primary antibodies for laminin (rabbit anti-laminin, 1:200; Millipore, Temecula, California, USA; AB19012) or collagen-IV (goat anti collagen-IV, 1:200; Millipore, AB769) were applied, whereas alpha smooth muscle actin (α-SMA, mouse anti α-SMA, 1:200; Dako, Glostrup, Denmark; M0851) was used to demark vascular smooth muscle cells of arterial vessels. Microglia were identified using antibodies directed against Tmem119 (rabbit anti TMEM119, 1:200, Abcam, Cambridge, UK), P2RY12 (rabbit anti P2RY12, 1:200, Sigma, Taufkirchen, Germany) or Iba-1 (rabbit anti Iba-1, 1:200; Wako, Osaka, Japan; 01919741), while MHC-II expression was addressed using a rat anti MHC-II antibody (1:200, Biolegend, San Diego, USA, 107602). Immunolabeling of CD11c-expressing microglia (rabbit anti CD11c, 1:100, Synaptic Systems, Göttingen, Germany) was performed in each of the applied reporter mouse models. Primary antibodies were allowed to incubate on the sections over night at 4 °C. After thorough rinsing, appropriate fluorochrome (AlexaFluor 488, AlexaFluor 568 or AlexaFluor 647) secondary antibodies (1:250, Life technologies, Eugene, OR, USA) were applied for 90 min at room temperature followed by thorough rinsing and counterstaining of nuclei with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1:10,000, Sigma) and subsequent mounting and embedding under cover glasses using fluorescence mounting medium (Dako, Hamburg, Germany).

In human post-mortem brain tissue, tissue specific autofluorescence was quenched using Sudan black dissolved in 70% ethanol at 60 °C for 30 s prior to mounting under cover glasses.

## Electron microscopy

For electron microscopy, animals were transcardially perfused with PBS followed by a fixative containing PBS with 4% PFA (Serva) and 0.1% glutaraldehyde (Serva). Next, serial sections of 50  $\mu\text{m}$  thickness were cut using a vibrating microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), collected in PBS, and blocked with 5% NGS in Tris-buffered saline (TBS). Sections were incubated over night at 4 °C with Iba-1 primary antibody (1:200; Wako). After rinsing in TBS samples were incubated with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:250; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; B8895). Sections were then rinsed in TBS and incubated with ExtrAvidin Peroxidase (1:100, Sigma-Aldrich) for 1 h followed by peroxidase-dependent visualization with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) in TBS. Sections were further stained with 0.5% osmium tetroxide (EMS, Hatfield, PA, USA), dehydrated and further stained in 1% uranyl acetate (Serva) followed by final dehydration and incubation in Durcupan (Sigma-Aldrich). The sections were embedded in between coated microscope slides and coverslips and polymerized at 56 °C for 48 h. Regions of interest were located by light microscopy, marked and transferred on blocks of resin to prepare ultra-thin serial sections of 55 nm thickness using an ultra-microtome (Leica Microsystems) and transferred on formvar-coated copper grids. Finally, samples were stained with lead citrate. Analysis was performed with a Zeiss SIGMA electron microscope (Zeiss NTS, Oberkochen, Germany).

## Quantification and statistical analysis

Fluorescence microscopy-based analyses were performed using a confocal laser scanning microscope (Olympus FluoView FV 1000, Olympus, Hamburg, Germany). Arteries, capillaries and veins were differentiated by diameter and presence or absence of  $\alpha$ -SMA immunoreactivity (Hanske et al. 2016; Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). In brief, arteries were identified by their expression of  $\alpha$ -SMA and a diameter larger than 10  $\mu\text{m}$ , whereas vessels with a diameter larger than 10  $\mu\text{m}$  and a lacking immunoreactivity for  $\alpha$ -SMA were considered as post-capillary venules or veins. As the vascular wall of post-capillary venules and veins is regularly lacking a continuous layer of vascular smooth muscle cells within the CNS, they were not further differentiated for the intended analyses (Edvinsson et al. 1983; Hanske et al. 2016). Capillaries were identified by a diameter smaller than 10  $\mu\text{m}$ . For each type of vessel, per mouse, at least 1000  $\mu\text{m}$  of vascular length were analysed. Contacts of microglial processes with the glia limitans were counted using ImageJ software (NIH, USA). Thereby, either the average number of contacts per mm of vascular length was calculated, or the average number of contacts per  $\text{mm}^2$

of basement membrane surface to normalize for differing vascular calibers between capillaries and arteries or veins. Acquisition settings were kept constant for each of the performed analyses. To capture minor peripheral microglial processes, gray values of the brighter cell bodies regularly appear saturated. Statistical analysis was performed with Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). For multiple comparisons, the one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's Multiple Comparison was applied, whereas the Mann–Whitney test was used to check for statistical significance between two groups. In general, a  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

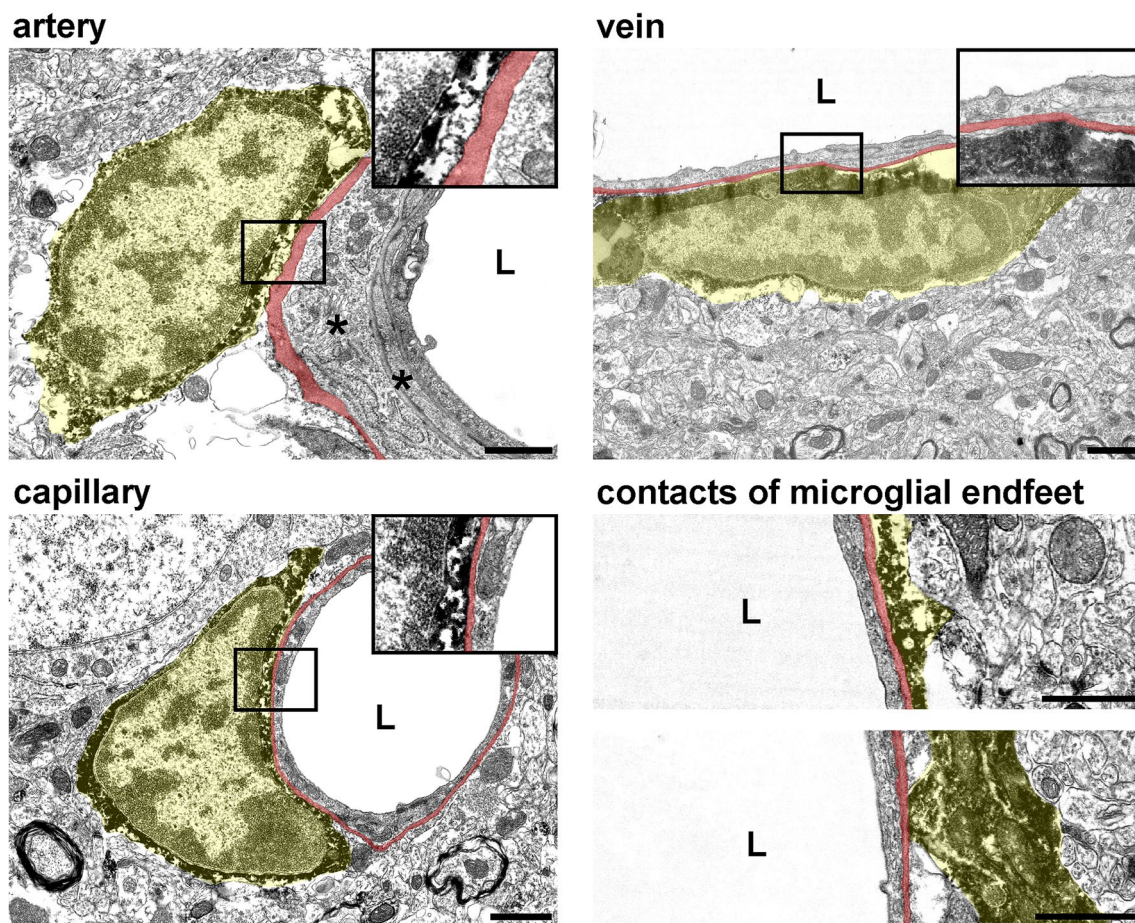
### Electron microscopy reveals a microglial participation in the formation of the glia limitans of arteries, capillaries and veins

To determine whether microglial processes contribute to the formation of the glia limitans around arteries, capillaries and veins, we performed electron microscopy in brain sections of wild-type C57Bl/6 mice. For clear-cut identification of microglial cells, vibratome sections determined for electron microscopy analyses were immunolabeled for the microglia marker Iba-1 prior to the embedding in resin and prior to preparation of ultra-thin sections. While capillaries can easily be distinguished from larger blood vessels by a small diameter of less than 10  $\mu\text{m}$  with only one or two endothelial cells contributing to the luminal circumference, vessels of a larger diameter are regarded as arteries or veins, depending on the presence or absence of vascular smooth muscle cells. While arteries regularly exhibit a continuous layer of smooth muscle cells, even larger cerebral veins do not show a tunica media consisting of smooth muscle cells (Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). Of note, direct microglial contacts to the glial basement membrane were regularly observed throughout the cerebral vascular tree, including arteries, capillaries and veins (Fig. 1). Thereby, in all the mice analyzed ( $n=5$ ), microglial contacts were not only observed for cell bodies, but for microglial endfeet as well (Fig. 1).

### Capillaries show the highest density of microglial contacts in the glia limitans compared to arteries and veins

To quantitatively address differences in the distribution of microglial contacts to the glia limitans in different vessel types, we applied confocal laser scanning microscopy in sections obtained from CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice, which offer the advantage of a very bright GFP signal, even in the smallest



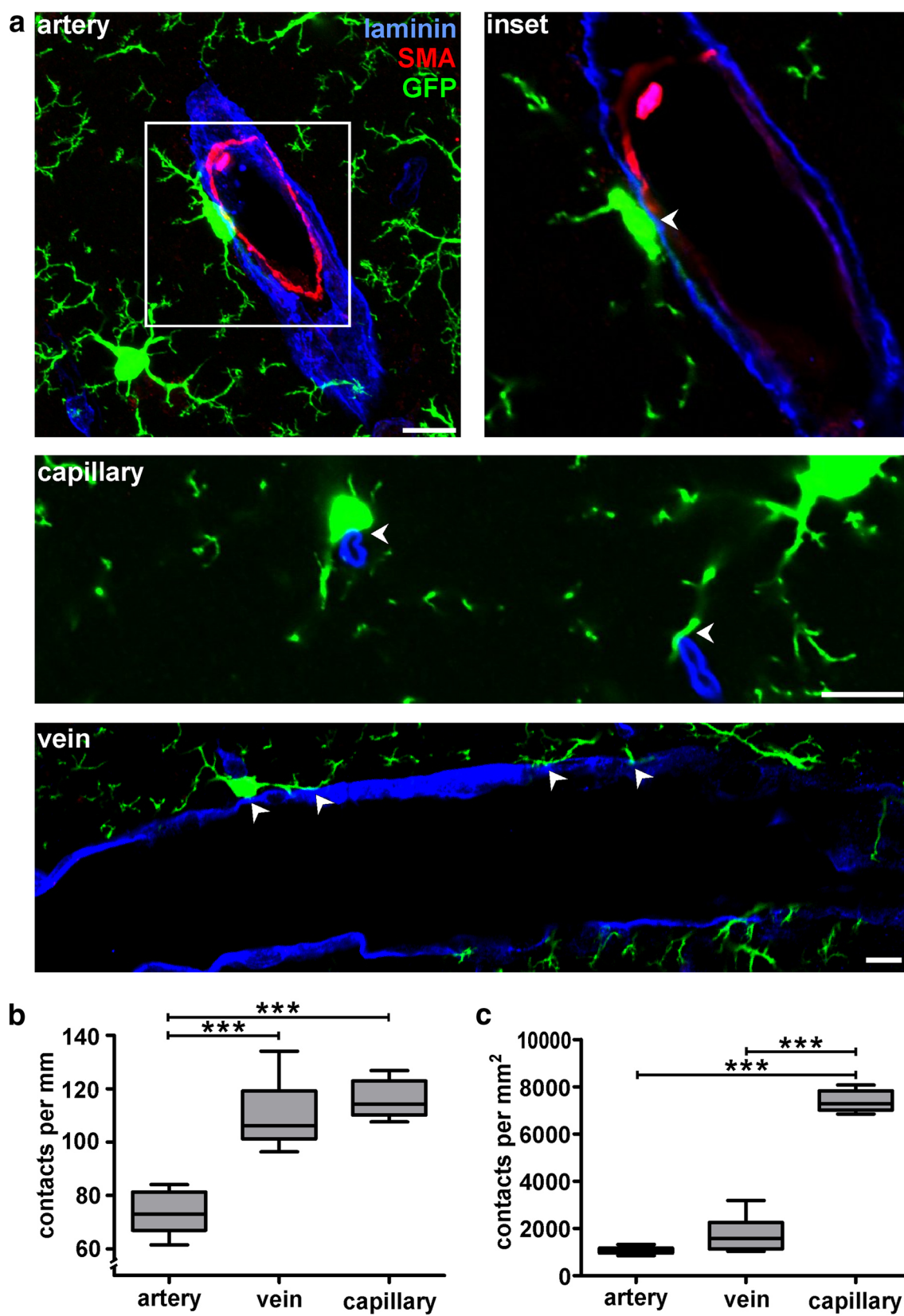


**Fig. 1** Immune electron microscopy demonstrates the direct contact of Iba-1-labeled microglia (transparently highlighted in yellow) towards the glial basement membrane (transparently highlighted in red) in the arterial, capillary and venous segments of the vascular tree. Of note, microglial contacts not only comprise the cell bodies,

but also microglial endfeet as individual cellular processes. Insets show representative contact sites at higher magnification. Here, the electron-dense DAB grains of the Iba-1 immunolabeling can be easily recognized. L = vascular lumen, asterisk = arterial smooth muscle cell, Scale bars: 1  $\mu$ m

microglial endfeet (Jung et al. 2000). Here, a polyclonal pan-laminin antibody was used to delineate vascular and glia limitans-related basement membranes (Sixt et al. 2001). For the intended analyses, capillary vessels can easily be identified by a diameter smaller than 10  $\mu$ m, whereas arteries can be distinguished by their  $\alpha$ -SMA immunoreactivity, which is lacking in post-capillary venules and veins (Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). Since CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice do not allow the differentiation of intrinsic microglia from peripheral or other CNS macrophages residing in perivascular spaces, our analyses were confined to parenchymal GFP-positive cells and processes. Here, double immunofluorescence labeling of the specific microglial markers TMEM119 and P2YR12 confirmed that the parenchymal CX3CR1<sup>+/GFP</sup>-positive population is also positive for both microglia-specific markers (Supplementary Fig. 1). Importantly, a subpopulation of the CX3CR1<sup>+/GFP</sup>-positive microglia also expressed the complement receptor CD11c (Supplementary Fig. 2),

which is also expressed on dendritic cells (Geissmann et al. 2010). Next, parenchymal CX3CR1<sup>+/GFP</sup>-positive microglial contacts to laminin-positive glial basement membranes were counted using high power magnification in confocal single planes, whereas GFP-positive cells within perivascular spaces were not included. In detail, the analyses comprised at least 1000  $\mu$ m of vascular length for each type of vessel in each of the analyzed animals (Fig. 2a). Thereby, the lowest numbers of microglial contacts to the glia limitans per mm of vascular length were observed around arteries, while a significantly higher microglial contribution ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison) was observed around capillaries and veins (Fig. 2b). In consideration of the larger diameters of arteries and veins with a consequentially greater outer vascular surface, we further analyzed the density of microglial contacts per area ( $\text{mm}^2$ ) to normalize for differing diameters and the differing areas of vascular surface covered by the





**Fig. 2 a** Confocal laser scanning microscopy of CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice illustrates contacts of GFP-positive microglia to the glial basement membrane around arterial, capillary and venous vessels. Vascular and glial basement membranes are demarked by anti-laminin immunolabeling, whereas SMA immunolabeling is used to identify arterial vascular smooth muscle cells. Upper panel, left: Z-projection showing an arterial vessel. The inset demarks the area of the confocal single plane image demonstrating the microglial contact (arrow head) to the glial basement membrane. For the vein and capillary, only confocal single plane images are shown. Scale bars: 10  $\mu$ m. **b** Quantification of microglial contacts per mm of vascular length ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison). **c** Analysis of the density of microglial contacts per mm<sup>2</sup> of vascular circumference normalizing for differences of diameter-related changes of the glial basement membrane surface ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison)

glial basement membrane, respectively. Importantly, this approach clearly demonstrates a four times higher density of microglial endfeet participating in the glia limitans at the capillary level compared to arteries and veins, which robustly reached statistical significance ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison) (Fig. 2c).

### Microglia participate in the formation of the glia limitans in human post-mortem brain tissue

To investigate the contribution of microglia in the formation of the glia limitans in humans, we extended our analyses to human post-mortem brain tissue without evidence for neuropathological disorders. Importantly, the visualization of human glial and vascular basement membranes with available antibodies in our hands proved to work much better using antibodies directed against collagen-IV compared to laminin. Therefore, we applied triple immunofluorescence labeling of collagen-IV to demark basement membranes, Iba-1 to identify microglial cells and their endfeet as well as  $\alpha$ -SMA to discriminate between arteries and veins. Of note and in line with the analyzed mouse tissue, microglial contacts to the glial basement membrane were observed around arteries, capillaries and veins (Fig. 3). However, as the human tissue was limited, a detailed quantitative analysis was not performed.

### Distribution of microglial contacts remains unaltered, while contact size of individual endfeet is increased around arteries and veins under EAE conditions

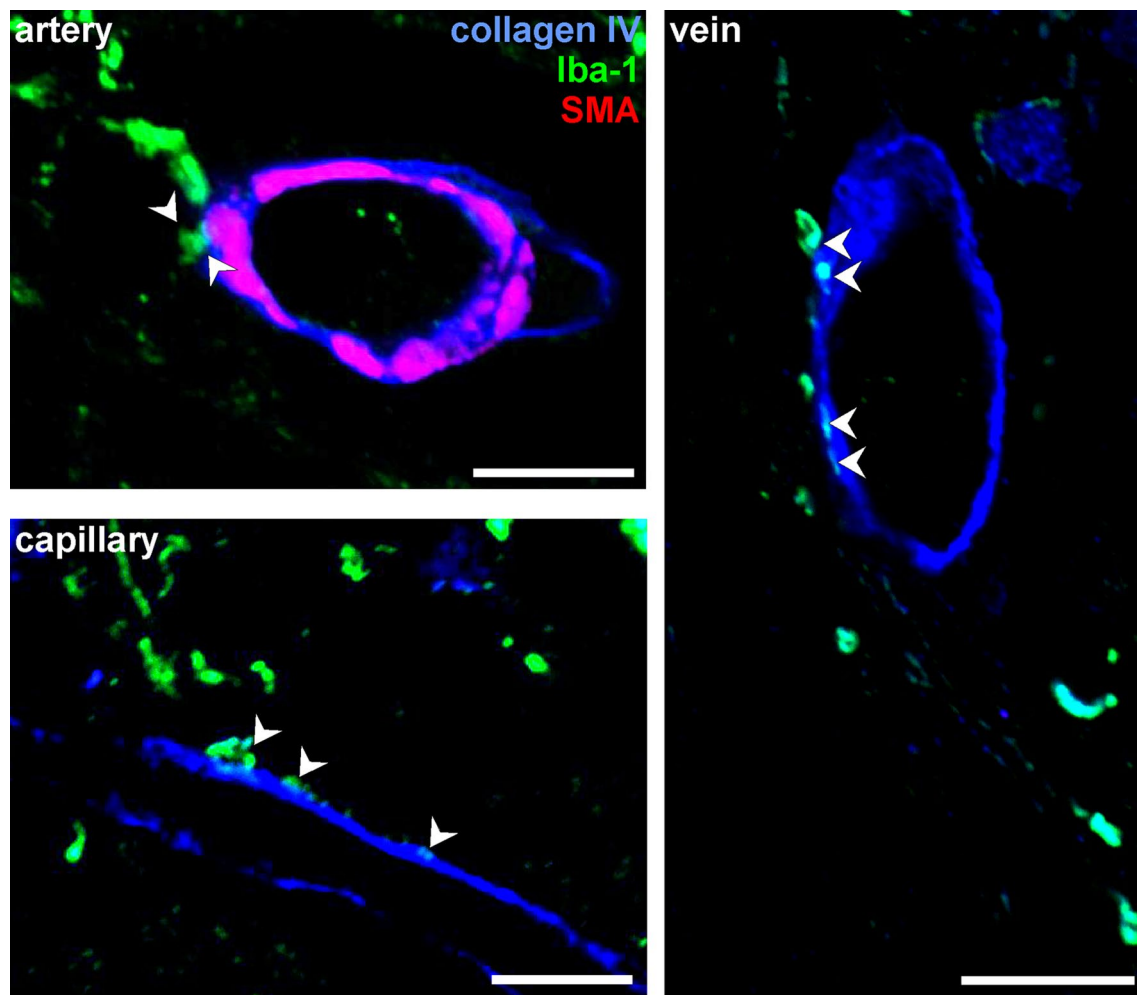
Since extravasation of leukocytes under neuroinflammatory conditions is known to preferentially occur in post-capillary venules (Agrawal et al. 2006; Bechmann et al. 2007), we hypothesized that the density of microglial contacts is likely to increase in the setting of neuroinflammation.

To investigate alterations in the distribution of microglial contacts to the glial basement membrane under inflammatory conditions, we applied the model of EAE in CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mice. Importantly, this model offers the advantage to discriminate resident microglia from infiltrating blood-borne leukocytes, since the reporter tomato is only expressed in resident microglia and CNS-associated macrophages such as perivascular macrophages (Goldmann et al. 2016). The latter can easily be excluded from the analysis by their localization on the vascular surface of the glial basement membrane. Noteworthy, although the microglial CX3CR1-related tomato expression was found to be increased in the setting of acute and chronic EAE (Fig. 4), we did not observe a difference in the density of microglial basement membrane contacts between the chronic, acute phase and non-immunized animals, respectively (Fig. 5). In line with the findings obtained from the CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice described above, the highest density of microglial endfeet contacting the glia limitans was observed in the capillary segment (Fig. 5a). However, as individual microglial endfeet in the setting of EAE appeared less slender and rather blunt, we next measured the average contact length per endfeet in the setting of EAE compared to non-immunized animals. Here, the general contact length appeared to be increased in the setting of EAE (Fig. 5b), reaching statistical significance in the arterial and venous segments compared to non-immunized animals ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison), while a robust trend towards an increased contact length was observed at the capillary level (Fig. 5b). To rule out whether there are differences between post-capillary venules showing infiltrates of leukocytes and post-capillary venules lacking these infiltrates, we further grouped and compared the venous vessels for their presence EAE-related infiltrates. Here, the direct comparison did neither reveal statistically significant differences for the distribution nor in the individual contact length of microglial endfeet (Supplementary Fig. 3).

No differences were observed for the average microglial contact length when comparing the acute and chronic phase EAE animals (not shown).

### MHC-II expression is up-regulated in microglia of the glia limitans irrespective of the presence of perivascular infiltrates under inflammatory conditions

In contrast to peripheral and other brain macrophages, microglia are lacking MHC-II expression under physiological conditions (Immig et al. 2015), whereas their capacity of an MHC-II/CD86-dependent antigen presentation has been shown under experimental conditions (Bechmann et al. 2001; Ebner et al. 2013; Schettters et al. 2017). Therefore, we further analyzed



**Fig. 3** Triple immunofluorescence labeling demonstrates the presence of microglial contacts (arrow heads) to the glial basement membrane in human post-mortem brain tissue. Microglia are demarked by Iba-1

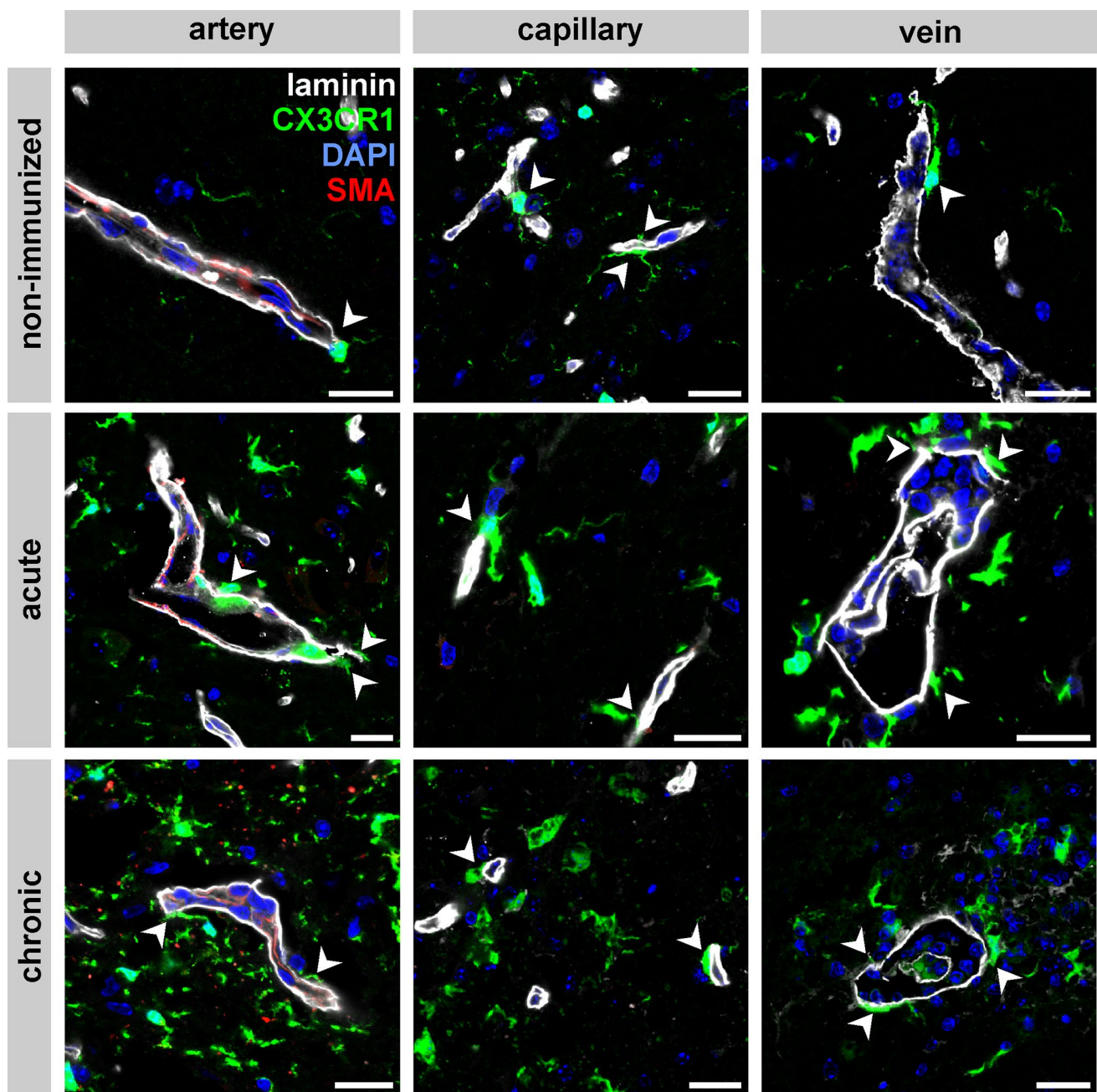
immunolabeling, whereas collagen-IV is used to identify vascular and glial basement membranes. Arteries are identified by  $\alpha$ -SMA-positive vascular smooth muscle cells. Scale bars: 10  $\mu$ m

whether an upregulation of MHC-II in the setting of EAE also involves microglia of the glia limitans. While non-immunized animals are lacking a microglial expression of MHC-II, the latter is only observed for perivascular macrophages (Fig. 6). In contrast, acute and chronic phase EAE tissue shows a dramatic increase of MHC-II expression in parenchymal microglia, which also involves microglia participating in the formation of the glia limitans. Of note, this expression does not depend on the presence of perivascular infiltrates of leukocytes around veins or post-capillary venules but is also observed at the level of capillaries (Fig. 6).

## Discussion

Although microglia are lacking MHC-II expression under physiological conditions (Immig et al. 2015), their capacity of an MHC-II/CD86 dependent antigen presentation

has been demonstrated upon challenge under experimental conditions (Ebner et al. 2013; Schetters et al. 2017). In this context, their potential role as gatekeepers for infiltrating T cells has been discussed (Engelhardt et al. 2016). It is, therefore, important to note that microglia are reported to contribute to the formation of the perivascular glia limitans under inflammatory conditions and in predilection areas of multiple sclerosis (Lassmann et al. 1991; Proding et al. 2011), which renders them ideally positioned to control or respond to leukocyte infiltration. However, the NVU represents a highly specialized structure which not only functionally, but also morphologically differs when comparing arterial, capillary and venous segments of the vascular tree. Furthermore, leukocyte infiltrations are predominantly found around post-capillary venules being linked to the presence of certain laminin isoforms in vascular basement membranes (Sixt et al. 2001). Therefore, the present study was aimed to investigate the distribution of the microglial participation



**Fig. 4** Multiple fluorescence labeling of non-immunized, acute and chronic stage EAE CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mice illustrating the contribution of microglia (green) to the glia limitans (arrow heads). The vascular and glial basement membranes are outlined by anti-laminin immunolabeling. SMA immunolabeling of vascular smooth muscle cells is used to identify arterial vessels. While

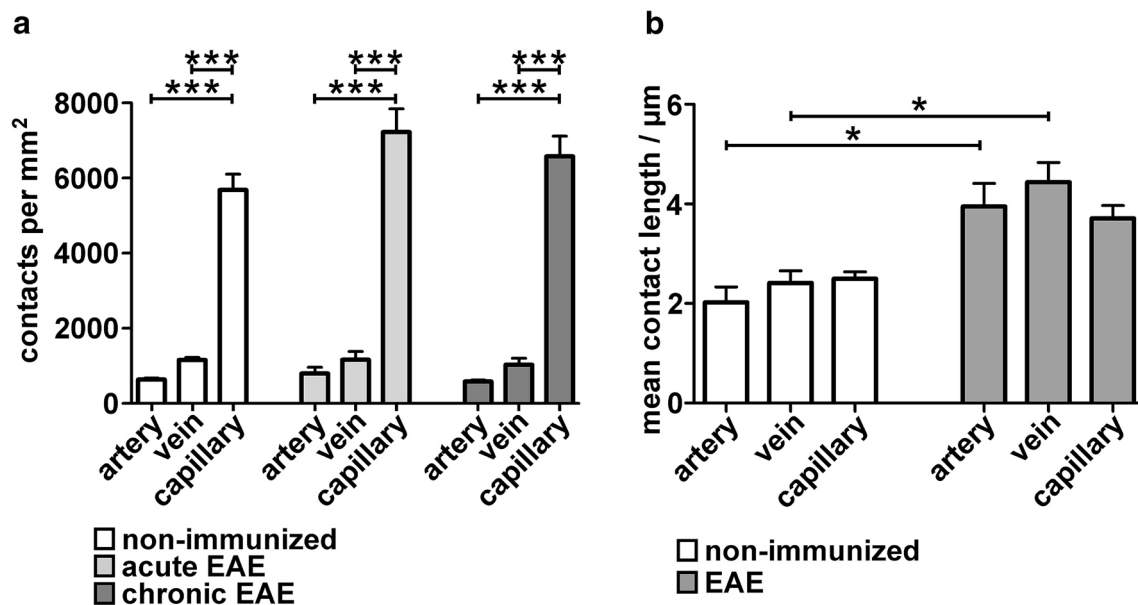
microglial contacts to the glial basement membrane are regularly observed throughout arterial, capillary and venous vessels in non-immunized and EAE animals, individual microglial cells as well as their endfeet contacting the basement membrane appear less slender and rather blunt in EAE animals. Nuclei are visualized with DAPI. Scale bars: 20  $\mu$ m

in the glia limitans throughout the vascular tree in arterial vessels, capillaries and veins.

For this purpose, immunolabeling of the microglial marker Iba-1 in combination with DAB was applied on PFA/GA- fixed mouse brain sections. Here, microglia were found to regularly participate in the formation of the glia limitans

around arteries, capillaries and veins. These contacts were not only found for microglial cell bodies, but also for smaller processes, all of which directly contact the glial basement membrane. Although Iba-1 immunolabeling alone does not allow a differentiation between parenchymal microglia and macrophages residing in perivascular spaces (Goldmann





**Fig. 5** **a** Density of microglial endfeet contacting the glial basement membrane of arteries, capillaries and veins in non-immunized, acute and chronic stage EAE animals ( $p < 0.001$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison, non-immunized:  $n = 3$ , acute EAE:  $n = 6$ , chronic EAE:  $n = 5$ ). **b** Analysis of the mean

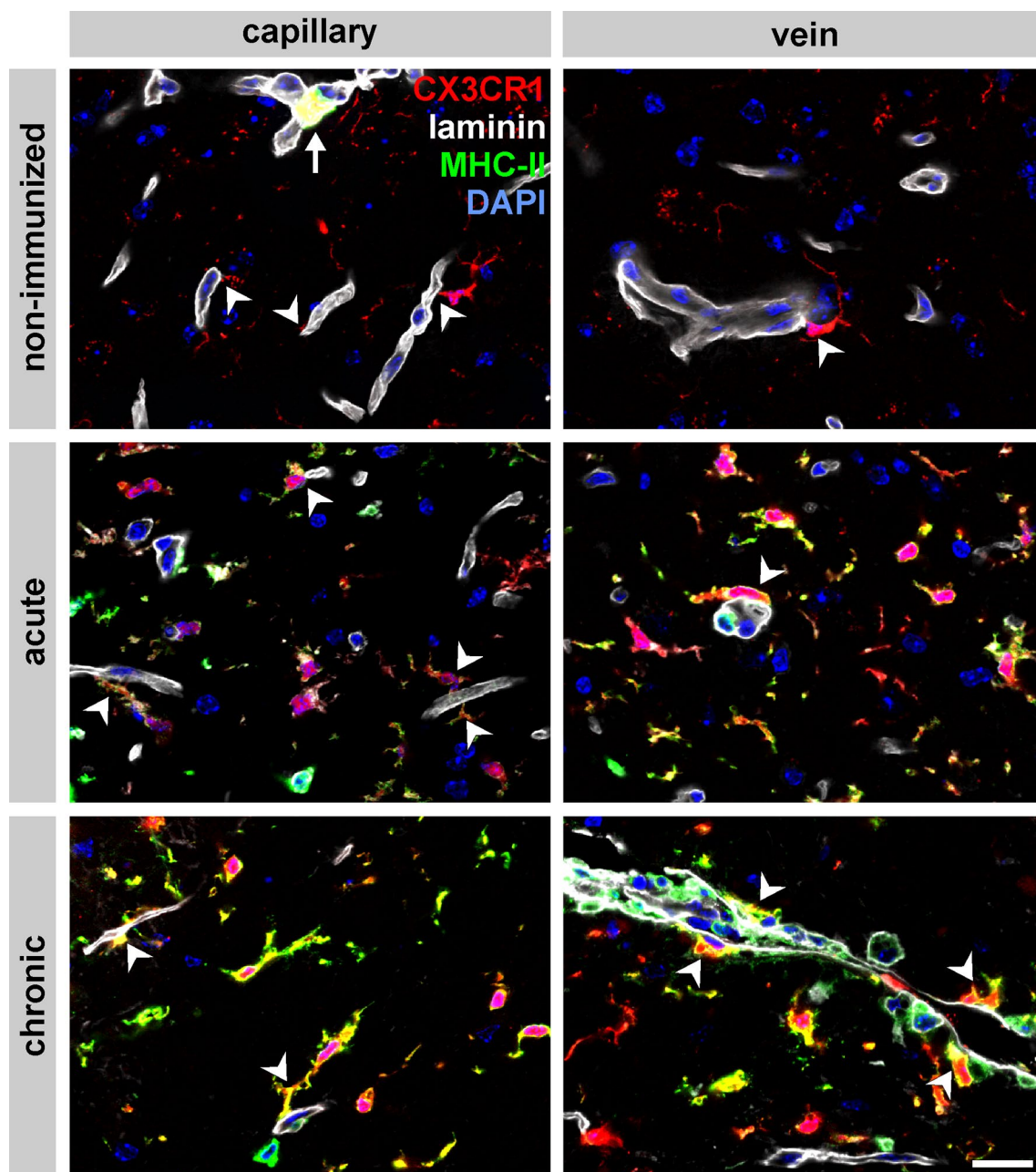
contact length of individual microglial endfeet to the glial basement membrane in non-immunized and EAE animals ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison, non-immunized:  $n = 3$ , EAE:  $n = 11$ )

et al. 2016), microglia can easily be distinguished by their parenchymal localization, whereas Iba-1 immunopositive macrophages residing in perivascular spaces were not included in the present analysis. After confirming the direct microglial contact to the astroglial basement membrane, we next tried to address the density of microglial contacts to the glia limitans comparing arteries, capillaries and veins. For this purpose, we applied confocal laser scanning microscopy in sections obtained from CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice (Jung et al. 2000). Using this model, microglia were identified by their CX3CR1-dependent GFP expression, while laminin and collagen-IV immunolabeling was used to identify vessels and the glial basement membranes as well (Sext et al. 2001; Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). Of note, this approach not only allows to label each type of vessel, irrespective of the position in the vascular tree, but also in the absence of additional methods for antigen retrieval (Sext et al. 2001; Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). Here, capillary vessels can easily be identified by a diameter smaller than 10  $\mu\text{m}$ , whereas arteries can be distinguished by their immunoreactivity for  $\alpha\text{-SMA}$ , which is lacking in post-capillary venules or larger veins (Hawkes et al. 2011; Krueger et al. 2017). Importantly, after normalizing for different vascular calibers, the highest density of microglial endfeet contacting the astroglial basement membrane is demonstrated for capillaries. Since capillaries are shown to predominantly contribute to blood-brain barrier breakdown in the setting of experimental stroke (Krueger et al. 2017),

it is important to note that microglia have been identified to mediate cerebrovascular permeability following ischemia (Su et al. 2017). In this setting, juxtavascular microglia contacting the vascular wall have also been hypothesized to be involved in the phagocytosis of ischemia-affected endothelial cells (Jolivel et al. 2015), although the authors leave open the question whether or not microglia are capable to overcome the vascular basement membranes.

In the setting of neuroinflammation, post-capillary venules are regarded as preferential sites of leukocyte infiltration (Agrawal et al. 2006). Here, leukocyte transmigration across the glia limitans is known to depend on a matrix-metalloproteinase-mediated cleavage of dystroglycan to detach astrocytic endfeet from the parenchymal basement membrane (Agrawal et al. 2006; Hannocks et al. 2017).

Therefore, we further investigated the distribution of microglial endfeet in the glia limitans under neuroinflammatory conditions in the setting of EAE, which represents an established animal model of multiple sclerosis (Lassmann and Bradl 2017). As infiltrates of blood-borne leukocytes are known to express typical microglial markers, we took advantage of the CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mouse model (Goldmann et al. 2016). Thus, resident CX3CR1+ microglia can be distinguished from extravasated myeloid cells, which was a prerequisite for the intended analyses. Importantly, in both CX3CR1-related reporter mouse models, CX3CR1-positive cells were not only found to co-express the specific microglial markers TMEM119



**Fig. 6** Multiple immunofluorescence labeling of non-immunized, acute and chronic stage EAE CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mice illustrating the contribution microglia (red) to the glia limitans (arrow heads). The vascular and glial basement membranes are outlined by anti-laminin immunolabeling. In non-immunized animals, MHC-II expression is confined to perivascular macrophages (arrow), while parenchymal microglia are lacking MHC-II expression. In con-

trast, acute and chronic stage EAE animals show an upregulation of MHC-II in parenchymal microglia as well as in microglia contacting the glial basement membrane (arrow heads). Of note, MHC-II expression is not confined to microglia around veins with perivascular infiltrates but is also observed at the level of capillaries. Nuclei are visualized with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m

and P2YR12 (Bennett et al. 2016; Mildner et al. 2017). Moreover, a subpopulation of CX3CR1- positive microglia also expressed the complement receptor CD11c, which is also expressed on dendritic cells of various organs (Geissmann et al. 2010; Immig et al. 2015). Although we initially hypothesized that the density of microglial endfeet within

the glia limitans would be increased under neuroinflammatory conditions, especially at the level of post-capillary venules, the relative density remained unaltered when compared to non-immunized animals. Again, the highest density was observed around capillary vessels. Of note, especially at the level of post-capillary venules an increase of the microglial

endfeet density was neither detectable when comparing EAE animals to the non-immunized controls, nor when comparing acute and chronic phase animals. However, in direct comparison to the non-immunized animals microglial processes appeared to be thicker under EAE conditions. Analysis of the mean length of individual microglial contacts to the basement membrane revealed that the individual contact size was increased throughout arteries, capillaries and veins, with the most pronounced increase at the level of veins showing peri- and juxtavascular infiltrates of leukocytes. Of note, microglia have been shown to represent a source of matrix metalloproteinases thereby potentially promoting the infiltration of leukocytes into the adjacent neuropil. However, in the setting of EAE this expression is specifically downregulated in microglia, which potentially reflects their transition from a rather resting to an activated state (Toft-Hansen et al. 2004).

Since microglia as gatekeepers under neuroinflammatory conditions (Engelhardt et al. 2016) would be ideally positioned at the glia limitans of post-capillary venules and veins, we further explored their capacity of MHC-II expression (Ebner et al. 2013; Schettters et al. 2017) in the setting of EAE to investigate differences between juxtavascular microglia around capillaries and post-capillary venules. Of note, the increase of microglial MHC-II expression did not only involve parenchymal microglia, but also microglia contributing to the glia limitans. Here, MHC-II-positive microglia were not only present around post-capillary venules and veins, but also at the level of capillaries showing no infiltrates of leukocytes at all. In this context, it is important to note that microglial processes have been described to extend through the vascular wall into the vascular lumen, which would allow a direct communication with the peripheral immune system (Barkauskas et al. 2013). As this feature would have multiple implications for leukocyte recruitment, we extensively searched for microglial endfeet reaching into perivascular spaces or the vascular lumen in serial sections for electron microscopy. However, we did not find a single microglial process penetrating the glial basement membrane. Given that the average thickness of the glial basement membrane is only measuring 20 nm (Thomsen et al. 2017), these structures are clearly below the diffraction barrier and even below the resolution limit of super resolution microscopy (Hell and Wichmann 1994). Therefore, confocal and two-photon images may offer the false impression that microglial endfeet penetrate the glia limitans or even the vascular wall, especially in tangentially sectioned vessels.

Although the present study tends to be rather descriptive in its design and the data presented, we here for the first time systematically investigate the microglial contribution to the glia limitans along the vascular tree under physiological conditions and in the setting of neuroinflammation, as well as in human brain tissue. Since several neuropathologies

including stroke, Alzheimer's disease, cancer, neurodegenerative diseases and neuroinflammation (Liebner et al. 2018; Rodrigues et al. 2012; Sweeney et al. 2018) share the feature of a vascular affection, the presented findings and analyses may help to investigate the role of microglia within the NVU in different neuropathologies.

**Funding** This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB Grant 1052 'Obesity mechanisms') to IB.

## Compliance with ethical standards

**Conflicts of interest** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human tissue were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Research involving human and/or animal participants** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

## References

- Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opendaker G, Sorokin LM (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007–1019. <https://doi.org/10.1084/jem.20051342>
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* 117:145–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3)
- Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnár Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D (2017) Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Rep* 18:391–405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>
- Barkauskas DS, Evans TA, Myers J, Petrosiute A, Silver J, Huang AY (2013) Extravascular CX3CR1<sup>+</sup> cells extend intravascular dendritic processes into intact central nervous system vessel lumen. *Microsc Microanal* 19:778–790. <https://doi.org/10.1017/S1431927613000482>
- Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simbürger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol* 168:242–249. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7618>
- Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J (2005) Circulating monocyte cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 19:647–649. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2599fje>



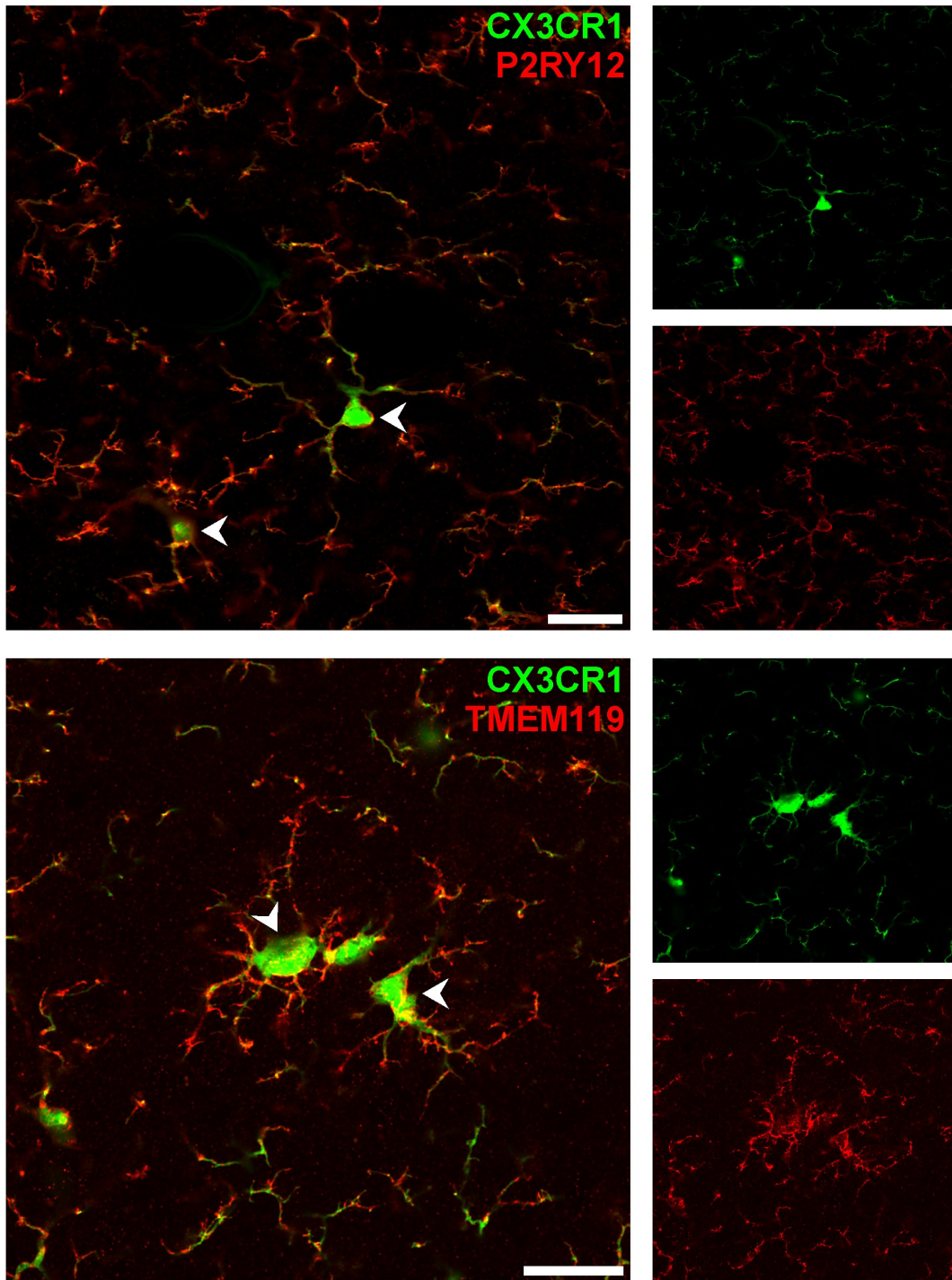
- Bechmann I, Galea I, Perry VH (2007) What is the blood–brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28:5–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.007>
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E1738–E1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Colonna M, Butovsky O (2017) Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35:441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I (2013) The blood–brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:763–773. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9473-5>
- Ebner F, Brandt C, Thiele P, Richter D, Schliesser U, Siffrin V, Schueler J, Stubbe T, Ellinghaus A, Meisel C, Sawitzki B, Nitsch R (2013) Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol* 191:5594–5602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203331>
- Edvinsson L, Högestätt ED, Uddman R, Auer LM (1983) Cerebral veins: fluorescence histochemistry, electron microscopy, and in vitro reactivity. *J Cereb Blood Flow Metab* 3(2):226–230
- Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flugel A, Laman JD, Weller RO (2016) Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 132:317–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1606-5>
- Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 10:453–460. <https://doi.org/10.1038/nri2784>
- Gertig U, Hanisch U-K (2014) Microglial diversity by responses and responders. *Front Cell Neurosci* 8:101. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00101>
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, Brendecke SM, Kierdorf K, Staszewski O, Datta M, Luedde T, Heikenwalder M, Jung S, Prinz M (2013) A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci* 16:1618–1626. <https://doi.org/10.1038/nn.3531>
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordao MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FMV, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M (2016) Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17:797–805. <https://doi.org/10.1038/ni.3423>
- Hannocks M-J, Zhang X, Gerwien H, Chashchina A, Burmeister M, Korpos E, Song J, Sorokin L (2017) The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.007>
- Hanske S, Dyrna F, Bechmann I, Krueger M (2016) Different segments of the cerebral vasculature reveal specific endothelial specifications, while tight junction proteins appear equally distributed. *Brain Struct Funct*. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1267-0>
- Hawkes CA, Härtig W, Kacza J, Schliebs R, Weller RO, Nicoll JA, Carare RO (2011) Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 121:431–443. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0801-7>
- Hefendehl JK, Neher JJ, Sühs RB, Kohsaka S, Skodras A, Jucker M (2014) Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell* 13:60–69. <https://doi.org/10.1111/accel.12149>
- Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19:780–782
- Immig K, Gericke M, Menzel F, Merz F, Krueger M, Schiefenhover F, Losche A, Jager K, Hanisch U-K, Biber K, Bechmann I (2015) CD11c-positive cells from brain, spleen, lung, and liver exhibit site-specific immune phenotypes and plastically adapt to new environments. *Glia* 63:611–625. <https://doi.org/10.1002/glia.22771>
- Jolivel V, Bicker F, Binamé F, Ploen R, Keller S, Gollan R, Jurek B, Birkenstock J, Poisa-Beiro L, Bruttger J, Opitz V, Thal SC, Waisman A, Bäuerle T, Schäfer MK, Zipp F, Schmidt MHH (2015) Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol* 129:279–295. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1372-1>
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>
- Kierdorf K, Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127:3201–3209. <https://doi.org/10.1172/JCI90602>
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguer EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16:273–280. <https://doi.org/10.1038/nn.3318>
- Krueger M, Härtig W, Frydrychowicz C, Mueller WC, Reichenbach A, Bechmann I, Michalski D (2017) Stroke-induced blood–brain barrier breakdown along the vascular tree - No preferential affection of arteries in different animal models and in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:2539–2554. <https://doi.org/10.1177/0271678X16670922>
- Lassmann H, Bradl M (2017) Multiple sclerosis: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133:223–244. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>
- Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF (1991) Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28:236–243. <https://doi.org/10.1002/jnr.490280211>
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G (2018) Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* 135:311–336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch U-K, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544–1553. <https://doi.org/10.1038/nn2015>
- Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017) P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65:375–387. <https://doi.org/10.1002/glia.23097>
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central

- nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101:249–255
- O'Loughlin E, Madore C, Lassmann H, Butovsky O (2018) Microglial phenotypes and functions in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028993>
- Poliani PL, Wang Y, Fontana E, Robinette ML, Yamanishi Y, Gillfillan S, Colonna M (2015) TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J Clin Invest* 125:2161–2170. <https://doi.org/10.1172/JCI77983>
- Prodinger C, Bunse J, Kruger M, Schiefenhovel F, Brandt C, Laman JD, Greter M, Immig K, Heppner F, Becher B, Bechmann I (2011) CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 121:445–458. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0774-y>
- Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Louis MK, Willing AE, Borlongan CV, Sanberg PR, Voltarelli JC, Garbuzova-Davis S (2012) Neurovascular aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 102:91–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386986-9.00004-1>
- Schettlers STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y (2017) Neuroinflammation: microglia and T Cells get ready to tango. *Front Immunol* 8:1905. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01905>
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K (2007) Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55:412–424. <https://doi.org/10.1002/glia.20468>
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F., Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM (2001) Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood–brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153(5):933–946
- Streit WJ, Braak H, Xue Q-S, Bechmann I (2009) Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:475–485. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>
- Su EJ, Cao C, Fredriksson L, Nilsson I, Stefanitsch C, Stevenson TK, Zhao J, Ragsdale M, Sun Y-Y, Yepes M, Kuan C-Y, Eriksson U, Strickland DK, Lawrence DA, Zhang L (2017) Microglial-mediated PDGF-CC activation increases cerebrovascular permeability during ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 134:585–604. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1749-z>
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV (2018) Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14:133. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.188>
- Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernández-Klett F, Lin G, Datta M, Drougard A, Stempf T, Ardura-Fabregat A, Staszewski O, Margineanu A, Sporbert A, Steinmetz LM, Pospisilik JA, Jung S, Priller J, Grün D, Ronneberger O, Prinz M (2017) A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci* 20:793–803. <https://doi.org/10.1038/nn.4547>
- Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:3300–3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>
- Tischer J, Krueger M, Mueller W, Staszewski O, Prinz M, Streit WJ, Bechmann I (2016) Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia* 64:1562–1572. <https://doi.org/10.1002/glia.23024>
- Toft-Hansen H, Nuttall RK, Edwards DR, Owens T (2004) Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 173:5209–5218. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.5209>
- Tremblay M-È, Zettel ML, Ison JR, Allen PD, Majewska AK (2012) Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60:541–558. <https://doi.org/10.1002/glia.22287>
- Wieghofer P, Knobloch K-P, Prinz M (2015) Genetic targeting of microglia. *Glia* 63:1–22. <https://doi.org/10.1002/glia.22727>
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, Robenek H, Tryggvason K, Song J, Korpos E, Loser K, Beissert S, Georges-Labouesse E, Sorokin LM (2009) Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* 15:519–527. <https://doi.org/10.1038/nm.1957>
- Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L (2013) Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr* 7:101–110. <https://doi.org/10.4161/cam.22680>
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV (2015) Establishment and dysfunction of the blood–brain barrier. *Cell* 163:1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 5 Zusatzmaterial

### Supplementary Figure 1



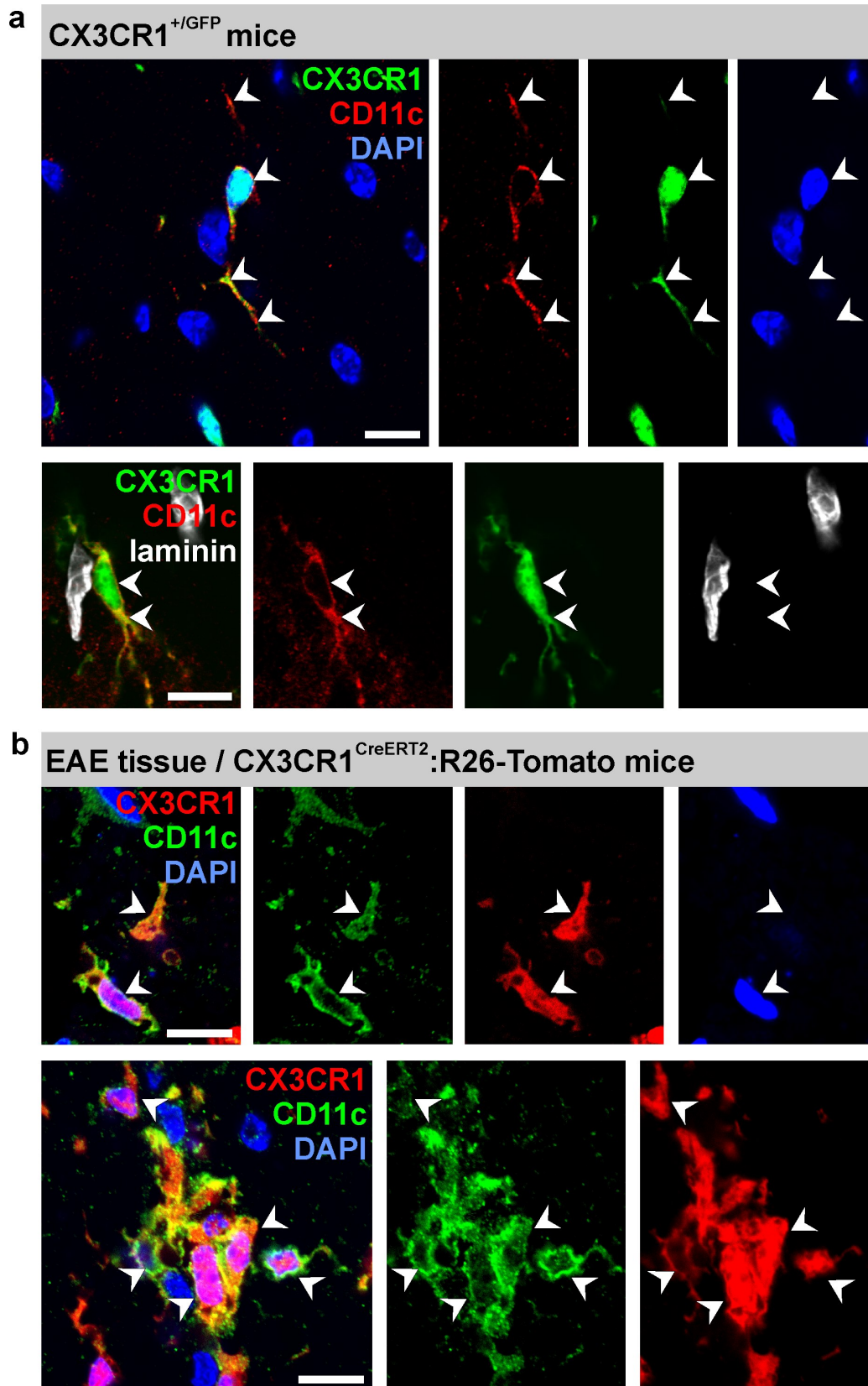
#### Supplementary figure 1

Immunofluorescence labeling of the microglial markers P2RY12 and TMEM119 in CX3CR1<sup>+/GFP</sup> mice showing co-localizations of both markers with the CX3CR1-related GFP signal to illustrate the specificity of CX3CR1<sup>+/GFP</sup> signal on parenchymal microglia.

Scale bar: 20µm



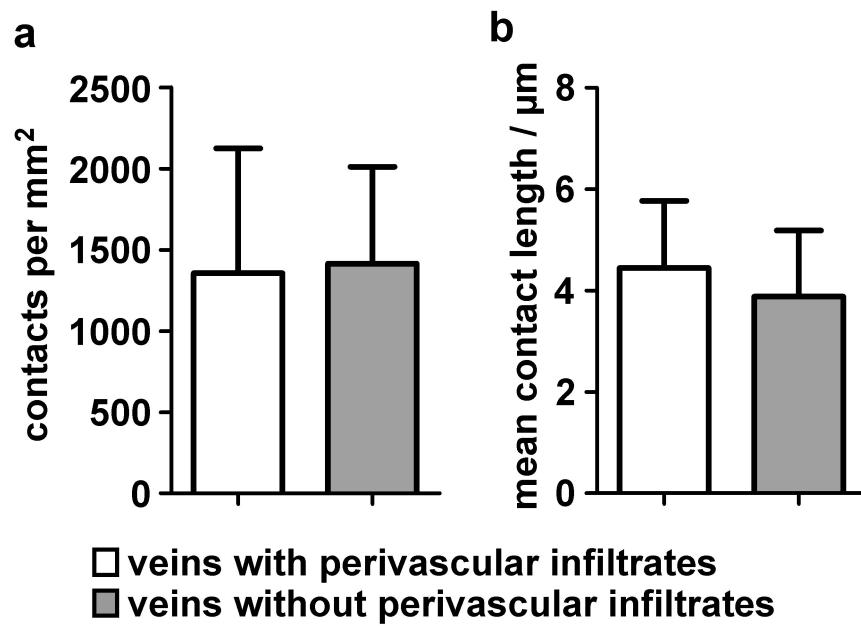
## Supplementary Figure 2



### Supplementary figure 2

Immunofluorescence labeling of CD11c showing co-localizations (arrow heads) of CX3CR1- positive microglia in the CX3CR1<sup>+/GFP</sup> reporter mouse model under physiological conditions (A) and in the CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato reporter mouse model in the setting of EAE (B). CD11c/ CX3CR1 co-expressing cells are also found in direct contact to the glial basement membrane (laminin). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 10µm

### Supplementary figure 3



### Supplementary figure 3

a) Comparison of the density of microglial endfeet contacting the glial basement membrane of veins showing perivascular infiltrates and veins without perivascular infiltrates in the setting of EAE. b) Analysis of the mean contact length of individual microglial endfeet to the glial basement membrane. (a:  $p=0.81$ , b:  $p=0.15$ ; Mann Whitney test,  $n=11$ ; Data are given as means; Error bars indicate standard deviation of the mean)



## 6 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Morphologische Studien zur Beteiligung der Mikroglia an der Glia limitans

eingereicht von Emely Joost

angefertigt an / in Universität Leipzig / Institut für Anatomie

betreut von Prof. Dr. med. Ingo Bechmann / PD Dr. med. Martin Krüger

Eingereicht im November 2020

Als hochspezialisierte Immunzellen übernehmen Mikroglia essenzielle Aufgaben im komplexen System der Neurovaskulären Einheit (NVE) und sind damit maßgeblich für die Homöostase des Zentralen Nervensystems (ZNS) verantwortlich. Alterationen mikroglialer Funktionen sind ursächlich an vielen Neuropathologien, unter anderem der Multiplen Sklerose (MS), beteiligt. Damit stellen Mikrogliazellen ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von ZNS-Erkrankungen dar. Die Erkenntnis, dass Mikroglia an der Bildung der Glia limitans beteiligt sind, ist bereits über 25 Jahre alt. Dennoch fehlte bisher eine systematische Darstellung der Interaktion von Mikrogliazellen mit der Glia limitans. Insbesondere unter Berücksichtigung der unterschiedlichen funktionellen und morphologischen Zusammensetzung der

NVE entlang des zerebralen Gefäßsystems ist eine detaillierte Untersuchung jener Interaktion in den verschiedenen Gefäßabschnitten von hoher Relevanz.

Wir widmeten uns daher der Frage, ob Mikrogliazellen in allen Abschnitten des zerebralen Gefäßsystems Kontakt zur Glia limitans aufbauen. Dazu führten wir zunächst elektronenmikroskopische Studien im Mausmodell unter physiologischen Bedingungen durch. Mittels Immunhistochemie konnten wir Mikrogliazellen in Wildtypmäusen lichtmikroskopisch darstellen, was die Auswahl spezifischer Regionen zur ultrastrukturellen Untersuchung ermöglichte. In anschließenden Semidünnschnitten konnten wir die genaue Lokalisation der Mikrogliazellen bestimmen und die entscheidenden Regionen für die ultrastrukturelle Analyse im Elektronenmikroskop aufarbeiten. Elektronenmikroskopisch konnten wir zeigen, dass Mikroglia in allen untersuchten Tieren und in allen Abschnitten des Gefäßsystems regelmäßige Kontakte mit der Basalmembran der Glia limitans ausbilden.

Um quantitative Unterschiede in der Verteilung der Kontakte von Mikrogliazellen mit der Glia limitans in den verschiedenen Gefäßabschnitten nachzuweisen, nutzten wir die Immunfluoreszenz-mehrfachmarkierung. Dabei verwendeten wir einen transgenen Mausstamm, in dem das Gen auf dem Locus für den Fraktalkin-Rezeptor CX3CR1, der in monozytären Zellen wie Mikrogliazellen exprimiert wird, durch ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) ersetzt wurde (n=6). Zusätzlich wurden die zerebralen Gefäße mittels eines Pan-Laminin Antikörpers markiert, wobei arterielle Gefäße durch zusätzliche Markierung der Aktin-Expression in glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA) von venösen Gefäßen unterschieden werden konnten. Mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie wurden anschließend Kontakte zwischen Mikroglia und parenchymaler Basalmembran markiert und quantifiziert. Wir konnten nachweisen, dass die Dichte der Kontakte im kapillaren Gefäßsegment ungefähr vierfach über der in venösen und arteriellen Gebieten lag.

Daran anschließend analysierten wir die Verteilung von Gefäßkontakten im Rahmen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), um mögliche Veränderungen unter inflammatorischen Bedingungen im Vergleich zum physiologischen Zustand nachzuweisen. Unter Verwendung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus untersuchten wir Rückenmarksschnitte von Mäusen in unterschiedlichen Stadien einer EAE (akute Phase n=6, chronische Phase n=5, Kontrollgruppe n=3). Verwendet wurden in diesem Fall CX3CR1<sup>CreERT2</sup>:R26-Tomato Reportermäuse, welche die Unterscheidung von eingewanderten

Makrophagen und ortsständigen Mikrogliazellen im Rahmen der Neuroinflammation ermöglichen. Entgegen der Annahme, dass sich unter inflammatorischen Bedingungen vor allem in postkapillären Venolen als Ort der Leukozytenextravasation die Dichte an Kontakten erhöht, konnte dies im Rahmen unserer Versuche nicht nachgewiesen werden. Trotz deutlicher leukozytärer Infiltrate (eng: perivascular cuffs) zeigte sich weiterhin eine stabile Verteilung der entsprechenden Kontakte mit signifikant höherer Kontaktdichte im kapillären Gefäßgebiet in allen Untersuchungsgruppen. Auffällig war hingegen eine signifikante Verbreiterung der Kontakte zwischen Mikrogliazellen und der Basalmembran in den venösen und arteriellen Gefäßsegmenten im Rahmen der EAE. Diese kann mit der zunehmenden amöboiden Konfiguration der Mikrogliazellen im Rahmen der Neuroinflammation erklärt werden.

Im Gegensatz zu vielen anderen Makrophagen exprimieren Mikrogliazellen unter physiologischen Bedingungen nicht regelhaft MHC-II, einige Subpopulationen erlangen diese Fähigkeit jedoch unter inflammatorischen Bedingungen. Wir gingen daher der Frage nach, ob auch juxtavaskuläre Mikroglia im Rahmen der EAE MHC-II exprimieren können. Mittels Immunfluoreszenzmehrfachmarkierung im verwendeten EAE-Modell konnten wir nachweisen, dass juxtavaskuläre Mikrogliazellen in der akuten und chronischen Phase MHC-II exprimieren können und dass diese Fähigkeit unabhängig vom Vorkommen perivaskulärer Infiltrate ist.

Zusätzlich behandelten wir die Frage, ob entsprechende Kontakte auch im menschlichen Gewebe nachweisbar sind. Menschliche Gewebeproben von Körperspendern des Instituts für Anatomie wurden wie oben beschrieben mittels Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Im menschlichen Gewebe konnten wir elektronenmikroskopisch und immunfluoreszenzmikroskopisch ebenfalls den Nachweis erbringen, dass unabhängig vom Gefäßtyp regelmäßig Kontakte zwischen Mikrogliafortsätzen und der Glia limitans ausgebildet werden.

In unserer Arbeit konnten wir erstmals systematisch die Beteiligung von Mikroglia an der Glia limitans unter physiologischen und pathologischen Bedingungen analysieren und damit zu einem besseren Verständnis des komplexen Zusammenspiels der unterschiedlichen Strukturen und Zellverbände der NVE beitragen. Wir konnten zeigen, dass sich Mikrogliazellen in einer günstigen Position befinden, welche ihnen zum einen über Antigenpräsentation die Kommunikation mit Leukozyten im perivaskulären Kompartiment sowie zum

anderen die Regulation der Leukozytenmigration ermöglicht. Die entsprechenden Kontakte zwischen Mikrogliazellen und der Basalmembran der Glia limitans konnten wir auch im menschlichen Gewebe nachweisen, sodass von einer hohen Relevanz unserer Ergebnisse für die klinische Forschung auszugehen ist. Da Mikrogliazellen in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen des ZNS eine entscheidende Rolle spielen, können die von uns verwendeten Methoden und gewonnenen Daten auf eine Vielzahl anderer Krankheitsmodelle übertragen werden, um die Rolle der Mikrogliazellen im Verlauf verschiedener Neuropathologien näher zu untersuchen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan; Patabendige, Adjanie A. K.; Dolman, Diana E. M.; Yusof, Siti R.; Begley, David J. (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. In: *Neurobiology of disease* 37 (1), S. 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Agrawal, Smriti; Anderson, Per; Durbeej, Madeleine; van Rooijen, Nico; Ivars, Fredrik; Opdenakker, Ghislain; Sorokin, Lydia M. (2006): Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (4), S. 1007–1019. DOI: 10.1084/jem.20051342.
- Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L.; Krieger, Charles; McNagny, Kelly M.; Rossi, Fabio M. V. (2011): Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. In: *Nature neuroscience* 14 (9), S. 1142–1149. DOI: 10.1038/nn.2887.
- Ajami, Bahareh; Bennett, Jami L.; Krieger, Charles; Tetzlaff, Wolfram; Rossi, Fabio M. V. (2007): Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. In: *Nature neuroscience* 10 (12), S. 1538–1543. DOI: 10.1038/nn2014.
- Albargothy, Nazira J.; Johnston, David A.; MacGregor-Sharp, Matthew; Weller, Roy O.; Verma, Ajay; Hawkes, Cheryl A.; Carare, Roxana O. (2018): Convective influx/glymphatic system: tracers injected into the CSF enter and leave the brain along separate periaxonal basement membrane pathways. In: *Acta neuropathologica* 136 (1), S. 139–152. DOI: 10.1007/s00401-018-1862-7.
- Aldea, Roxana; Weller, Roy O.; Wilcock, Donna M.; Carare, Roxana O.; Richardson, Giles (2019): Cerebrovascular Smooth Muscle Cells as the Drivers of Intramural Periaxonal Drainage of the Brain. In: *Frontiers in aging neuroscience* 11, S. 1. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00001.
- Alliot, Francoise; Godin, Isabelle; Pessac, Bernard (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. In: *Developmental Brain Research* 117 (2), S. 145–152. DOI: 10.1016/S0165-3806(99)00113-3.
- Askew, Katharine; Li, Kaizhen; Olmos-Alonso, Adrian; Garcia-Moreno, Fernando; Liang, Yajie; Richardson, Philippa et al. (2017): Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. In: *Cell reports* 18 (2), S. 391–405. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.041.
- Bechmann, Ingo; Galea, Ian; Perry, V. Hugh (2007): What is the blood-brain barrier (not)? In: *Trends in immunology* 28 (1), S. 5–11. DOI: 10.1016/j.it.2006.11.007.
- Bennett, Mariko L.; Bennett, F. Chris; Liddel, Shane A.; Ajami, Bahareh; Zamanian, Jennifer L.; Fernhoff, Nathaniel B. et al. (2016): New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (12), E1738–46. DOI: 10.1073/pnas.1525528113.
- Bhalerao, Aditya; Sivandzade, Farzane; Archie, Sabrina Rahman; Chowdhury, Ekram Ahmed; Noorani, Behnam; Cucullo, Luca (2020): In vitro modeling of the neurovascular unit: advances in the field. In: *Fluids and barriers of the CNS* 17 (1), S. 22. DOI: 10.1186/s12987-020-00183-7.
- Biswas, Saptarshi; Cottarelli, Azzurra; Agalliu, Dritan (2020): Neuronal and glial regulation of CNS angiogenesis and barrierogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 147 (9). DOI: 10.1242/dev.182279.
- Butovsky, Oleg; Jedrychowski, Mark P.; Moore, Craig S.; Cialic, Ron; Lanser, Amanda J.; Gabriely, Galina et al. (2014): Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. In: *Nature neuroscience* 17 (1), S. 131–143. DOI: 10.1038/nn.3599.
- Cannella, B.; Cross, A. H.; Raine, C. S. (1990): Upregulation and coexpression of adhesion molecules correlate with relapsing autoimmune demyelination in the central nervous system. In: *The Journal of experimental medicine* 172 (5), S. 1521–1524. DOI: 10.1084/jem.172.5.1521.

- Castro Dias, Mariana; Mapunda, Josephine A.; Vladymyrov, Mykhailo; Engelhardt, Britta (2019): Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. In: *International journal of molecular sciences* 20 (21). DOI: 10.3390/ijms20215372.
- Colonna, Marco; Butovsky, Oleg (2017): Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. In: *Annual review of immunology* 35, S. 441–468. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
- Cooper-Knock, Johnathan; Green, Claire; Altschuler, Gabriel; Wei, Wenbin; Bury, Joanna J.; Heath, Paul R. et al. (2017): A data-driven approach links microglia to pathology and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Acta neuropathologica communications* 5 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s40478-017-0424-x.
- Daneman, Richard; Zhou, Lu; Kebede, Amanuel A.; Barres, Ben A. (2010): Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. In: *Nature* 468 (7323), S. 562–566. DOI: 10.1038/nature09513.
- Diserbo, Michel; Agin, Amaud; Lamproglou, Ioannis; Mauris, Jérôme; Staali, Fatiha; Multon, Eric; Amourette, Christine (2002): Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 80 (7), S. 670–678. DOI: 10.1139/y02-070.
- Dyrna, Felix; Hanske, Sophie; Krueger, Martin; Bechmann, Ingo (2013): The blood-brain barrier. In: *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (4), S. 763–773. DOI: 10.1007/s11481-013-9473-5.
- Edvinsson L; Högestätt ED; Uddman R; Auer LM (1983): Cerebral Veins: Fluorescence Histochemistry, Electron Microscopy, and in vitro Reactivity, zuletzt geprüft am 12.12.2018.
- Ehrlich, Paul (1885): Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Berlin: Hirschwald.
- Engelhardt, Britta; Carare, Roxana O.; Bechmann, Ingo; Flügel, Alexander; Laman, Jon D.; Weller, Roy O. (2016): Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. In: *Acta neuropathologica* 132 (3), S. 317–338. DOI: 10.1007/s00401-016-1606-5.
- Engelhardt, Britta; Coisne, Caroline (2011): Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. In: *Fluids and barriers of the CNS* 8 (1), S. 4. DOI: 10.1186/2045-8118-8-4.
- Engelhardt, Britta; Ransohoff, Richard M. (2005): The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. In: *Trends in immunology* 26 (9), S. 485–495. DOI: 10.1016/j.it.2005.07.004.
- Ford, A. L.; Goodsall, A. L.; Hickey, W. F.; Sedgwick, J. D. (1995): Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (9), S. 4309–4321.
- Gao, Zhen; Tsirka, Stella E. (2011): Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis. In: *Neurology research international* 2011, S. 383087. DOI: 10.1155/2011/383087.
- Gertig, Ulla; Hanisch, Uwe-Karsten (2014): Microglial diversity by responses and responders. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 101. DOI: 10.3389/fncel.2014.00101.
- Ginhoux, Florent; Greter, Melanie; Leboeuf, Marylene; Nandi, Sayan; See, Peter; Gokhan, Solen et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6005), S. 841–845. DOI: 10.1126/science.1194637.
- Ginhoux, Florent; Lim, Shawn; Hoeffel, Guillaume; Low, Donovan; Huber, Tara (2013): Origin and differentiation of microglia. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 45. DOI: 10.3389/fncel.2013.00045.
- Goldmann, Edwin E. (1913): Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus choroideus und der Hirnhäute. Berlin: Verlag der königlichen Akademie der Wissenschaften.

- Goldmann, Tobias; Prinz, Marco (2013): Role of microglia in CNS autoimmunity. In: *Clinical & developmental immunology* 2013, S. 208093. DOI: 10.1155/2013/208093.
- Goldmann, Tobias; Wieghofer, Peter; Jordao, Marta Joana Costa; Prutek, Fabiola; Hagemeyer, Nora; Frenzel, Kathrin et al. (2016): Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. In: *Nature immunology* 17 (7), S. 797–805. DOI: 10.1038/ni.3423.
- Graeber, M. B.; Streit, W. J. (1990): Perivascular microglia defined. In: *Trends in neurosciences* 13 (9), S. 366, zuletzt geprüft am 01.03.2017.
- Graeber, Manuel B.; Tetzlaff, Wolfram; Streit, Wolfgang J.; Kreutzberg, Georg W. (1988): Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. In: *Neuroscience letters* 85 (3), S. 317–321. DOI: 10.1016/0304-3940(88)90585-X.
- Guerrero, Brooke L.; Sicotte, Nancy L. (2020): Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? In: *Frontiers in immunology* 11, S. 374. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00374.
- Hannocks, M-J; Zhang, X.; Gerwien, H.; Chashchina, A.; Burmeister, M.; Korpos, E. et al. (2017): The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.11.007.
- Hanske, Sophie; Dyrna, Felix; Bechmann, Ingo; Krueger, Martin (2016): Different segments of the cerebral vasculature reveal specific endothelial specifications, while tight junction proteins appear equally distributed. In: *Brain structure & function*. DOI: 10.1007/s00429-016-1267-0.
- Harder, David R.; Zhang, Chenyang; Gebremedhin, Debebe (2002): Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. In: *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17, S. 27–31. DOI: 10.1152/physiologyonline.2002.17.1.27.
- Hefendehl, Jasmin K.; Neher, Jonas J.; Sühs, Rafael B.; Kohsaka, Shinichi; Skodras, Angelos; Jucker, Mathias (2014): Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. In: *Aging cell* 13 (1), S. 60–69. DOI: 10.1111/accel.12149.
- Heppner, Frank L.; Greter, Melanie; Marino, Denis; Falsig, Jeppe; Raivich, Gennadij; Hövelmeyer, Nadine et al. (2005): Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. In: *Nature medicine* 11 (2), S. 146–152. DOI: 10.1038/nm1177.
- Hess, David C.; Abe, Takanori; Hill, William D.; Studdard, Angeline Martin; Carothers, Jo; Masuya, Masahiro et al. (2004): Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. In: *Experimental neurology* 186 (2), S. 134–144. DOI: 10.1016/j.expneurol.2003.11.005.
- Hickey, W. F.; Kimura, H. (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. In: *Science (New York, N.Y.)* 239 (4837), S. 290–292.
- Hickman, Suzanne; Izzy, Saef; Sen, Pritha; Morsett, Liza; El Khoury, Joseph (2018): Microglia in neurodegeneration. In: *Nature neuroscience* 21 (10), S. 1359–1369. DOI: 10.1038/s41593-018-0242-x.
- Hickman, Suzanne E.; Kingery, Nathan D.; Ohsumi, Toshiro K.; Borowsky, Mark L.; Wang, Li-chong; Means, Terry K.; El Khoury, Joseph (2013): The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. In: *Nature neuroscience* 16 (12), S. 1896–1905. DOI: 10.1038/nn.3554.
- Hurtado-Alvarado, Gabriela; Cabañas-Morales, Adrian M.; Gómez-González, Beatriz (2014): Pericytes: brain-immune interface modulators. In: *Frontiers in integrative neuroscience* 7, S. 80. DOI: 10.3389/fnint.2013.00080.
- Immig, Kerstin; Gericke, Martin; Menzel, Franziska; Merz, Felicitas; Krueger, Martin; Schiefenhover, Fridtjof et al. (2015): CD11c-positive cells from brain, spleen, lung, and liver exhibit site-specific immune phenotypes and plastically adapt to new environments. In: *Glia* 63 (4), S. 611–625. DOI: 10.1002/glia.22771.
- Ito, Daisuke; Imai, Yoshinori; Ohsawa, Keiko; Nakajima, Kazuyuki; Fukuuchi, Yasuo; Kohsaka, Shinichi (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. In: *Molecular Brain Research* 57 (1), S. 1–9. DOI: 10.1016/S0169-328X(98)00040-0.

- Jolivel, Valérie; Bicker, Frank; Binamé, Fabien; Ploen, Robert; Keller, Stefanie; Gollan, René et al. (2015): Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. In: *Acta neuropathologica* 129 (2), S. 279–295. DOI: 10.1007/s00401-014-1372-1.
- Jordão, Marta Joana Costa; Sankowski, Roman; Brendecke, Stefanie M.; Sagar; Locatelli, Giuseppe; Tai, Yi-Heng et al. (2019): Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. In: *Science (New York, N.Y.)* 363 (6425). DOI: 10.1126/science.aat7554.
- Jung, S.; Aliberti, J.; Graemmel, P.; Sunshine, M. J.; Kreutzberg, G. W.; Sher, A.; Littman, D. R. (2000): Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (11), S. 4106–4114. DOI: 10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000.
- Kierdorf, Katrin; Erny, Daniel; Goldmann, Tobias; Sander, Victor; Schulz, Christian; Perdiguer, Elisa Gomez et al. (2013a): Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. In: *Nature neuroscience* 16 (3), S. 273–280. DOI: 10.1038/nn.3318.
- Kierdorf, Katrin; Katzmarski, Natalie; Haas, Carola A.; Prinz, Marco (2013b): Bone marrow cell recruitment to the brain in the absence of irradiation or parabiosis bias. In: *PLoS One* 8 (3), e58544. DOI: 10.1371/journal.pone.0058544.
- Kierdorf, Katrin; Masuda, Takahiro; Jordão, Marta Joana Costa; Prinz, Marco (2019): Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 20 (9), S. 547–562. DOI: 10.1038/s41583-019-0201-x.
- Kierdorf, Katrin; Prinz, Marco (2017): Microglia in steady state. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (9), S. 3201–3209. DOI: 10.1172/JCI90602.
- Köhler, Christoph (2007): Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. In: *Cell and tissue research* 330 (2), S. 291–302. DOI: 10.1007/s00441-007-0474-7.
- Könnecke, Helen; Bechmann, Ingo (2013): The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. In: *Clinical & developmental immunology* 2013, S. 914104. DOI: 10.1155/2013/914104.
- Kreutzberg, Georg W. (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. In: *Trends in neurosciences* 19 (8), S. 312–318. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Kronenberg, Golo; Uhlemann, Ria; Richter, Nadine; Klempin, Friederike; Wegner, Stephanie; Staerck, Lilian et al. (2017): Distinguishing features of microglia- and monocyte-derived macrophages after stroke. In: *Acta neuropathologica*. DOI: 10.1007/s00401-017-1795-6.
- Krueger, Martin; Bechmann, Ingo (2010): CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. In: *Glia* 58 (1), S. 1–10. DOI: 10.1002/glia.20898.
- Lassmann, H.; Zimprich, F.; Vass, K.; Hickey, W. F. (1991): Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. In: *Journal of neuroscience research* 28 (2), S. 236–243. DOI: 10.1002/jnr.490280211.
- Lassmann, Hans (2020): Pathology of inflammatory diseases of the nervous system: Human disease versus animal models. In: *Glia* 68 (4), S. 830–844. DOI: 10.1002/glia.23726.
- Lassmann, Hans; Bradl, Monika (2017): Multiple sclerosis. Experimental models and reality. In: *Acta neuropathologica* 133 (2), S. 223–244. DOI: 10.1007/s00401-016-1631-4.
- Lassmann, Hans; van Horssen, Jack; Mahad, Don (2012): Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. In: *Nature reviews. Neurology* 8 (11), S. 647–656. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.168.
- Lawson, L. J.; Perry, V. H.; Dri, P.; Gordon, S. (1990): Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. In: *Neuroscience* 39 (1), S. 151–170. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90229-W.



- Lawson, L. J.; Perry, V. H.; Gordon, S. (1992): Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. In: *Neuroscience* 48 (2), S. 405–415.
- Lewandowsky, Max: Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. In: *Zeitschrift für klinische Medizin* 1900 (40), S. 480–494.
- Li, Yu-Qing; Chen, Paul; Jain, Vipin; Reilly, Raymond M.; Wong, C. Shun (2004): Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. In: *Radiation research* 161 (2), S. 143–152. DOI: 10.1667/rr3117.
- Liebner, Stefan; Dijkhuizen, Rick M.; Reiss, Yvonne; Plate, Karl H.; Agalliu, Dritan; Constantin, Gabriela (2018): Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. In: *Acta neuropathologica* 135 (3), S. 311–336. DOI: 10.1007/s00401-018-1815-1.
- Luca, Ciro de; Colangelo, Anna Maria; Virtuoso, Assunta; Alberghina, Lilia; Papa, Michele (2020): Neurons, Glia, Extracellular Matrix and Neurovascular Unit: A Systems Biology Approach to the Complexity of Synaptic Plasticity in Health and Disease. In: *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041539.
- Maeda, A.; Sobel, R. A. (1996): Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55 (3), S. 300–309. DOI: 10.1097/00005072-199603000-00005.
- Michelucci, Alessandro; Heurtaux, Tony; Grandbarbe, Luc; Morga, Eleonora; Heuschling, Paul (2009): Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. In: *Journal of neuroimmunology* 210 (1-2), S. 3–12. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.003.
- Mildner, Alexander; Huang, Hao; Radke, Josefine; Stenzel, Werner; Priller, Josef (2017): P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. In: *Glia* 65 (2), S. 375–387. DOI: 10.1002/glia.23097.
- Mildner, Alexander; Schmidt, Hauke; Nitsche, Mirko; Merkler, Doron; Hanisch, Uwe-Karsten; Mack, Matthias et al. (2007): Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. In: *Nature neuroscience* 10 (12), S. 1544–1553. DOI: 10.1038/nn2015.
- Mittelbronn, M.; Dietz, K.; Schluesener, H. J.; Meyermann, R. (2001): Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. In: *Acta neuropathologica* 101 (3), S. 249–255.
- Mosser, Coralie-Anne; Baptista, Sofia; Arnoux, Isabelle; Audinat, Etienne (2017): Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. In: *Progress in neurobiology*. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.002.
- Nimmerjahn, Axel; Kirchhoff, Frank; Helmchen, Fritjof (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5726), S. 1314–1318. DOI: 10.1126/science.1110647.
- O'Loughlin, Elaine; Madore, Charlotte; Lassmann, Hans; Butovsky, Oleg (2018): Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a028993.
- Paris, Iñaki; Savage, Julie C.; Escobar, Laura; Abiega, Oihane; Gagnon, Steven; Hui, Chin-Wai et al. (2018): ProMolJ: A new tool for automatic three-dimensional analysis of microglial process motility. In: *Glia* 66 (4), S. 828–845. DOI: 10.1002/glia.23287.
- Parkhurst, Christopher N.; Yang, Guang; Ninan, Ipe; Savas, Jeffrey N.; Yates, John R.; Lafaille, Juan J. et al. (2013): Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. In: *Cell* 155 (7), S. 1596–1609. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.030.

- Plog, Benjamin A.; Nedergaard, Maiken (2018): The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. In: *Annual review of pathology* 13, S. 379–394. DOI: 10.1146/annurev-pathol-051217-111018.
- Priller, J.; Flugel, A.; Wehner, T.; Boentert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M. et al. (2001): Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system. Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. In: *Nature medicine* 7 (12), S. 1356–1361. DOI: 10.1038/nm1201-1356.
- Prinz, Marco; Erny, Daniel; Hagemeyer, Nora (2017): Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. In: *Nature immunology* 18 (4), S. 385–392. DOI: 10.1038/ni.3703.
- Prinz, Marco; Priller, Josef (2010): Tickets to the brain. Role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. In: *Journal of neuroimmunology* 224 (1-2), S. 80–84. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.015.
- Prodinger, Carolin; Bunse, Jorg; Kruger, Martin; Schiefenhover, Fridtjof; Brandt, Christine; Laman, Jon D. et al. (2011): CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. In: *Acta neuropathologica* 121 (4), S. 445–458. DOI: 10.1007/s00401-010-0774-y.
- Profaci, Caterina P.; Munji, Roeben N.; Pulido, Robert S.; Daneman, Richard (2020): The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. In: *The Journal of experimental medicine* 217 (4). DOI: 10.1084/jem.20190062.
- Ransohoff, Richard M. (2012): Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. In: *Nature neuroscience* 15 (8), S. 1074–1077. DOI: 10.1038/nn.3168.
- Ransohoff, Richard M. (2016): A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? In: *Nature neuroscience* 19 (8), S. 987–991. DOI: 10.1038/nn.4338.
- Ransohoff, Richard M.; Engelhardt, Britta (2012): The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (9), S. 623–635. DOI: 10.1038/nri3265.
- Reese, T. S.; Karnovsky, M. J. (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. In: *The journal of cell biology* (34), S. 207–217, zuletzt geprüft am 01.03.2017.
- Rio-Hortega, PioDel (1939): THE MICROGLIA. In: *The Lancet* 233 (6036), S. 1023–1026. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)60571-8.
- Sanchez-Guajardo, V.; Tentillier, N.; Romero-Ramos, M. (2015): The relation between  $\alpha$ -synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments. In: *Neuroscience* 302, S. 47–58. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.008.
- Schafer, Dorothy P.; Lehrman, Emily K.; Kautzman, Amanda G.; Koyama, Ryuta; Mardinly, Alan R.; Yamasaki, Ryo et al. (2012): Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. In: *Neuron* 74 (4), S. 691–705. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Schettters, Sjoerd T. T.; Gomez-Nicola, Diego; Garcia-Vallejo, Juan J.; van Kooyk, Yvette (2017): Neuroinflammation. Microglia and T Cells Get Ready to Tango. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1905. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01905.
- Shetty, Ashok K.; Zanirati, Gabriele (2020): The Interstitial System of the Brain in Health and Disease. In: *Aging and disease* 11 (1), S. 200–211. DOI: 10.14336/AD.2020.0103.
- Sierra, Amanda; Castro, Fernando de; Del Río-Hortega, Juan; Rafael Iglesias-Rozas, José; Garrosa, Manuel; Kettenmann, Helmut (2016): The "Big-Bang" for modern glial biology. Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. In: *Glia* 64 (11), S. 1801–1840. DOI: 10.1002/glia.23046.
- Sierra, Amanda; Gottfried-Blackmore, Andres C.; McEwen, Bruce S.; Bulloch, Karen (2007): Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. In: *Glia* 55 (4), S. 412–424. DOI: 10.1002/glia.20468.
- Sixt, Michael; Engelhardt, Britta; Pausch Friederike; Hallmann, Rupert; Wendler, Olaf; Sorokin, Lydia M. (2001): Endothelial Cell Laminin Isoforms, Laminins 8 and 10, Play Decisive Roles in T Cell Recruitment

Across the Blood–Brain Barrier in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *The journal of cell biology*, S. 933–946, zuletzt geprüft am 01.03.2017.

Song, Jian; Wu, Chuan; Korpos, Eva; Zhang, Xueli; Agrawal, Smriti M.; Wang, Ying et al. (2015): Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. In: *Cell reports* 10 (7), S. 1040–1054. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.037.

Stebbins, Matthew J.; Gastfriend, Benjamin D.; Canfield, Scott G.; Lee, Ming-Song; Richards, Drew; Faubion, Madeline G. et al. (2019): Human pluripotent stem cell-derived brain pericyte-like cells induce blood-brain barrier properties. In: *Science advances* 5 (3), eaau7375. DOI: 10.1126/sciadv.aau7375.

Stratoulis, Vassilis; Venero, Jose Luis; Tremblay, Marie-Ève; Joseph, Bertrand (2019): Microglial subtypes: diversity within the microglial community. In: *The EMBO journal* 38 (17), e101997. DOI: 10.15252/emboj.2019101997.

Streit, Wolfgang J.; Braak, Heiko; Xue, Qing-Shan; Bechmann, Ingo (2009): Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica* 118 (4), S. 475–485. DOI: 10.1007/s00401-009-0556-6.

Stromnes, Ingunn M.; Goverman, Joan M. (2006): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Nature protocols* 1 (4), S. 1810–1819. DOI: 10.1038/nprot.2006.285.

Su, Enming Joseph; Cao, Chunzhang; Fredriksson, Linda; Nilsson, Ingrid; Stefanitsch, Christina; Stevenson, Tamara K. et al. (2017): Microglial-mediated PDGF-CC activation increases cerebrovascular permeability during ischemic stroke. In: *Acta neuropathologica* 134 (4), S. 585–604. DOI: 10.1007/s00401-017-1749-z.

Swanborg, Robert H. (1995): Animal models of human disease Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. In: *Clinical Immunology and Immunopathology* 77 (1), S. 4–13. DOI: 10.1016/0090-1229(95)90130-2.

Sweeney, Melanie D.; Sagare, Abhay P.; Zlokovic, Berislav V. (2018): Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. In: *Nature Reviews Neurology* 14, 133 EP -. DOI: 10.1038/nrneurol.2017.188.

Tay, Tuan Leng; Mai, Dominic; Dautzenberg, Jana; Fernández-Klett, Francisco; Lin, Gen; Sagar et al. (2017): A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. In: *Nature neuroscience* 20 (6), S. 793–803. DOI: 10.1038/nn.4547.

Thomas, John H. (2019): Fluid dynamics of cerebrospinal fluid flow in perivascular spaces. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 16 (159), S. 20190572. DOI: 10.1098/rsif.2019.0572.

Thomsen, Maj S.; Routhe, Lisa J.; Moos, Torben (2017): The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 37 (10), S. 3300–3317. DOI: 10.1177/0271678X17722436.

Tischer, Jasmin; Krueger, Martin; Mueller, Wolf; Staszewski, Ori; Prinz, Marco; Streit, Wolfgang J.; Bechmann, Ingo (2016): Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. In: *Glia* 64 (9), S. 1562–1572. DOI: 10.1002/glia.23024.

Tremblay, Marie-Ève; Zettel, Martha L.; Ison, James R.; Allen, Paul D.; Majewska, Ania K. (2012): Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. In: *Glia* 60 (4), S. 541–558. DOI: 10.1002/glia.22287.

Wake, Hiroaki; Moorhouse, Andrew J.; Jinno, Shozo; Kohsaka, Shinichi; Nabekura, Junichi (2009): Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (13), S. 3974–3980. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009.

Wieghofer, Peter; Knobloch, Klaus-Peter; Prinz, Marco (2015): Genetic targeting of microglia. In: *Glia* 63 (1), S. 1–22. DOI: 10.1002/glia.22727.

Wolf, Susanne A.; Boddeke, H. W. G. M.; Kettenmann, Helmut (2017): Microglia in Physiology and Disease. In: *Annual review of physiology* 79, S. 619–643. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.

Wu, Chuan; Ivars, Fredrik; Anderson, Per; Hallmann, Rupert; Vestweber, Dietmar; Nilsson, Per et al. (2009): Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. In: *Nature medicine* 15 (5), S. 519–527. DOI: 10.1038/nm.1957.

Yousif, Lema F.; Di Russo, Jacopo; Sorokin, Lydia (2013): Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. In: *Cell adhesion & migration* 7 (1), S. 101–110. DOI: 10.4161/cam.22680.

Yu, Xing; Ji, Caihong; Shao, Anwen (2020): Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. In: *Frontiers in neuroscience* 14, S. 334. DOI: 10.3389/fnins.2020.00334.

## 8 Darstellung des eigenen Beitrags

Hiermit erkläre ich, Emely Joost, dass folgende Leistungen für das Manuskript Joost et al. 2019 „Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain tissue“ von mir erbracht wurden:

- Gewebeaufbereitung für Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie
- Anfertigung immunhistochemischer Färbungen und Immunfluoreszenzmehrfachmarkierungen
- Erstellung und Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen
- Anfertigung und Auswertung der gezeigten Immunfluoreszenzaufnahmen
- Statistische Auswertung
- Erstellung von Abbildungen und Tabellen
- Verfassen des Manuskripts und Mitarbeit bei späterer Überarbeitung

Emely Joost

Datum: 19.10.2020

Unterschrift:

### Gegenzeichnung durch Mitautor\*innen:

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann

Datum: 10.9.2020

Unterschrift:

PD Dr. med. Martin Krüger

Datum: 10.9.2020

Unterschrift:

Dr. rer. med. Bianca Mages

Datum: 10.09.2020

Unterschrift:

## 9 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

09.09.2020

Datum



Unterschrift

## 10 Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Onlineversion dieser Arbeit aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

**Publikation:**            **Joost, E;** Jordão, M; Mages, B; Prinz, M; Bechmann, I; Krueger, M (2019):  
Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under  
physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain  
tissue. In: *Brain structure & function* 224 (3), S. 1301-1314.

## 11 Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Anatomie in Leipzig. Bei der Erstellung dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Ingo Bechmann und Herrn PD Dr. med. Martin Krüger für die Überlassung des Themas sowie die zuverlässige Betreuung und konstruktive Sachkritik im Arbeitsprozess. Durch ihre Begeisterung für die Forschung, ihr umfassendes Wissen und die Ermunterung zum selbständigen Arbeiten haben sie mich bei der Umsetzung dieses Forschungsprojekts hervorragend unterstützt.

Ich bedanke mich bei meinen Koautorinnen und Koautoren für ihre verschiedenen Beiträge zur erfolgreichen Publikation der Ergebnisse. Weiterer Dank gilt allen Mitarbeiter\*innen und Doktorand\*innen des Institutes für Anatomie, welche mir in vielen Situationen freundlich mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere zu nennen sind hier Judith Craatz und Jana Brendler, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der größte Dank geht an meine Familie und Freund\*innen, die mich während der gesamten Zeit geduldig begleitet und mich in schwierigen Phasen stets motiviert haben. Vielen Dank.